#27

ISSN 0388-841 X

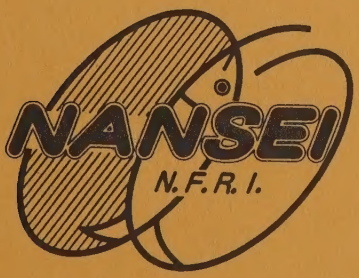
BULLETIN
OF
NANSEI NATIONAL FISHERIES RESEARCH INSTITUTE

NO. 27

南西海区水産研究所研究報告

第 27 号

LIBRARY
OCT 07 1994
National Marine Fisheries Service
2570 Dole Street
Honolulu, Hawaii



平成 6 年 3 月
水産庁南西海区水産研究所
広島県大野町

NANSEI NATIONAL FISHERIES RESEARCH INSTITUTE
FISHERIES AGENCY
OHNO-CHO, HIROSHIMA 739-04, JAPAN

March 1994

南西水研研報
Bull. Nansei Natl. Fish.
Res. Inst. No.27, 1-394, 1994.

南西海区水産研究所研究報告

第 27 号

目　　次

石田　実
Phylogeny of the suborder Scorpaenoidei
（カサゴ亜目魚類の系統分類学的研究）……1

鈴木　伸洋
養殖ヒラメ無眼側皮膚の微細構造とその体色異常性の組織学的検討……113

大迫　典久
ヒラメラブドウイルス（*Rhabdovirus olivaceus*）の感染症に関する研究……129

浜口　昌巳・薄　浩則・石岡　宏子
マダイの胸腺リンパ球の活性に及ぼす各種ステロイドの影響……233

内田　卓志
室蘭産渦鞭毛藻 *Scrippsiella trochoidea* のシスト形成・発芽に
及ぼす温度の影響……243

山口　峰生
Gymnodinium nagasakiense の赤潮発生機構と発生予知に関する
生理生態学的研究……251

南西水研研報
Bull. Nansei Natl. Fish.
Res. Inst. No.27, 1-112, 1994

Phylogeny of the Suborder Scorpaenoidei (Pisces: Scorpaeniformes)

Minoru ISHIDA

Fifty-five genera of the suborder Scorpaenoidei were examined in order to reconstruct their phylogenetic relationships. Ninety-five characters were selected following both myological and osteological examinations of the whole body as follows: muscles of the cheek, ventral surface of the head, serving the branchial arches, between the pectoral girdle, neurocranium, hyoid arch, and branchial arches, serving the pectoral fin, pelvic fin, dorsal and anal fins, and caudal fin, carinal muscles, body muscles, and swimbladder and associated muscles; neurocranium, nasal and circumorbital bones, jaws, suspensorium, hyoid arch, branchial arches, vertebrae and associated bones, caudal skeleton, pectoral girdle, pelvic girdle, and dorsal and anal fin supports.

Character polarities were primarily determined by comparisons with generalized percoids as an out-group, secondarily as unquestionably specialized conditions, or by comparisons with sebastids and scorpaenids as a functional out-group. Cladistic analyses based on the minimum number of evolutionary steps, without character reversals were performed.

The Scorpaenoidei was considered a natural group, because the other members of the Scorpaeniformes, including Hexagrammidae, Anoplopomatidae, Platycephaloidei, Triglidae, Peristediidae, and Cottoidei, have been shown to be derived from non-scorpaenoid ancestors. The relationships between the genera included in Scorpaenoidei were shown, the 11 major stems corresponding to familial categories. The relationships of the families were expressed as follows, using a sequencing convention: the Sebastidae, the Setarchidae plus Neosebastidae, the Scorpaenidae, the Apistidae plus Tetrarogidae, the Synanceiidae plus Congiopodidae, the Gnathanacanthidae, the Aploactinidae, and the Pataecidae. The following classification for Scorpaenoidei is proposed (only genera examined during this study are included): Sebastidae, including *Sebastes, Sebastiscus, Hozukius, Helicolenus, Adelosebastes, Sebastolobus, Trachyscorpia,* and *Plectrogenium;* Setarchidae, including *Setarches, Lioscorpius,* and *Ectreposebastes;* Neosebastidae, including *Neosebastes* and *Maxillicosta;* Scorpaenidae, including *Pontinus, Neomerinthe, Phenacoscorpius, Parascorpaena, Scorpaena, Iracundus, Scorpaenopsis, Scorpaenodes, Hoplosebastes, Pterois, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus, Parapterois, Rhinopias,* and *Taenianotus; Apistidae,* including *Apistus;* Tetrarogidae, including *Gymnapistes, Centropogon, Notesthes, Neocentropogon, Ocosia, Paracentropogon, Hypodytes, Liocranium, Ablabys,* and *Richardsonichthys;* Synanceiidae, including *Inimicus, Synanceia, Erosa, Choridactylus,* and *Minous;* Congiopodidae, including *Congiopodus, Alertichthys,* and *Zanclorhynchus;* Gnathanacanthidae, including *Gnathanacanthus;* Aploactinidae, including *Aploactis, Erisphex,* and *Sthenopus;* Pataecidae, including *Aetapcus, Pataecus,* and *Neopataecus.*

Key words: scorpaenoid fishes, myology, osteology, phylogeny, new classification

Received January19, 1994. Contribution No. A26 from the Nansei National Fisheries Research Institute, Ohno-cho, Saeki-gun, Hiroshima 739-04, Japan
Nansei National Fisheries Research Institute, Kochi Station, Sanbashidori, Kochi-shi, Kochi 780, Japan

Contents

Introduction ····· 3
I. Materials and methods ····· 4
II. Myology ····· 10
1. Muscles of the cheek ····· 10
2. Muscles of the ventral surface of the head ····· 16
3. Muscles serving the branchial arches ····· 18
4. Muscles between the pectoral girdle, neurocranium, hyoid arch, and branchial arches ····· 25
5. Muscles serving the pectoral fin ····· 27
6. Muscles serving the pelvic fin ····· 30
7. Muscles of the dorsal and anal fins ····· 32
8. Carinal muscles ····· 35
9. Muscles serving the caudal fin ····· 36
10. Body muscles ····· 39
11. Swimbladder and associated muscles ····· 44
III. Osteology ····· 46
1. Neurocranium ····· 46
2. Nasal and circumorbital bones ····· 51
3. Jaws ····· 53
4. Suspensorium ····· 53
5. Hyoid arch ····· 56
6. Branchial arches ····· 58
7. Vertebrae and associated bones ····· 61
8. Caudal skeleton ····· 62
9. Pectoral girdle ····· 65
10. Pelvic girdle ····· 68
11. Dorsal and anal fin supports ····· 68
IV. Phylogenetic consideration ····· 75
1. Character analysis ····· 75
2. Relationships ····· 93
Position of the Scorpaenoidei among the Scorpaeniformes ····· 93
Relationships within the Scorpaenoidei ····· 95

Sebastidae new family ····95
Setarchidae new family ····97
Neosebastidae new family ····97
Scorpaenidae ····98
Apistidae new family ····100
Tetrarogidae ····100
Synanceiidae ····101
Congiopodidae ····102
Gnathanacanthidae ····103
Aploactinidae ····103
Pataecidae ····103
New classification of the Scorpaenoidei ····104
Acknowledgments ····105
References ····107

The suborder Scorpaenoidei is a large and diverse group of about 100 genera and 500 species distributed in tropical and temperate seas world wide. Studies on scorpaeniforms made by GILL (1888), EIGENMANN and BEESON (1893, 1894), CRAMER (1895), ALLIS (1909), REGAN (1913), GUTBERLET (1915), GREGORY (1933), MATSUBARA (1934, 1936, 1940), DE BEER (1937), and BERG (1940) mainly described osteology, without considering phylogenetic relationships. MATSUBARA (1943) published the first comprehensive systematic work, in which he discussed the phylogenetic position and origin of the Scorpaenoidei within the Scorpaeniformes and the intergeneric relationships among the Scorpaenoidei, based on analyses of the infraorbitals, suspensorium, hyoid arch, neurocranium, pectoral girdle, and swimbladder of predominantly Japanese specimens. Many workers have subsequently investigated relationships of and within the Scorpaenoidei (MATSUBARA 1955, MATSUBARA and OCHIAI 1955, ESCHMEYER 1965ab, 1969, 1972, 1983, MORELAND 1960, BARSUKOV 1964, 1968, 1970, 1972ab, 1973ab, 1981, QUAST 1965, ESCHMEYER and COLLETTE 1966, ESCHMEYER and HUREAU 1971, CHEN 1971, 1981, ESCHMEYER *et al.* 1973, ESCHMEYER, ABE, and NAKANO 1979, ESCHMEYER, HALLACHER, and RAMA-RAO 1979, ESCHMEYER, RAMA-RAO, and HALLACHER 1979, ESCHMEYER and RAMA-RAO 1973, 1977, POSS and ESCHMEYER 1975, 1978, 1979, 1980, ESCHMEYER and POSS 1976, KANAYAMA and AMAOKA 1981, POSS 1982, POSS and SPRINGER 1983, ISHIDA and AMAOKA 1986, 1989, 1992). In addition to osteological characters, myological characters have also been considered important in the construction of teleostean phylogenies (GREENWOOD *et al.* 1966, LIEM 1970, 1978, 1981, GREENWOOD 1971,

Greenwood and Lauder 1981, Winterbottom 1974ab, Howes 1976, 1980, Liem and Greenwood 1981, Kaufman and Liem 1982, Lauder and Liem 1983). Myological studies of Scorpaeniformes were carried out by Hallacher (1974) and Yabe (1985), the former examining the extrinsic muscles of *Sebastes* and the other scorpaeniforms, and the latter, musculature of several scorpaenoids in a detailed study on cottoid phylogeny.

Many authors have suggested, rather than a monophyletic origin, a polyphyletic derivation of Scorpaeniformes from several perciforms or lower groups (Matsubara 1943, Quast 1965, Greenwood *et al.* 1966, Nelson 1976, 1984, Washington *et al.* 1984). However, for half a century, a comprehensive analysis of the phylogeny of scorpaenoids has not been made, most authors essentially following a higher classification along the lines proposed by Matsubara (1943).

This study attempts to reconstruct the phylogenetic relationships of the Scorpaenoidei by the examination and analyses of overall skeletal and muscular systems of scorpaenoid fishes worldwide, and thereby propose a new and "up-to-date" classification of the Scorpaenoidei.

I. Materials and Methods

Specimens were stained with alizarin red and variously counterstained for cartilage with alcian blue. After dissection, they were drawn using a stereoscopic dissecting microscope with a drawing tube. Institutional abbreviations follow Leviton *et al.* (1985). Specimen sizes indicate standard length.

Specimens Examined:

Sebastidae

Sebastes vulpes, HUMZ 63771, 162.8 mm

Sebastiscus marmoratus, HUMZ 33139, 180.2 mm

Hozukius emblemarius, HUMZ 35282, 168.4 mm

Helicolenus hilgendorfi, HUMZ 49329, 129.8 mm

Adelosebastes latens, HUMZ 71927, 250.0 mm

Sebastolobus macrochir, HUMZ 92139, 161.9 mm

Trachyscorpia capensis, FSFL-EB 611, 217.6 mm

Plectrogenium nanum, HUMZ 74811, 60.8 mm

Setarchidae

Setarches longimanus, HUMZ 51734, 141.1 mm

Lioscorpius longiceps, CAS 34866, 76.9 mm

Ectreposebastes imus, HUMZ 75110, 145.8 mm

Neosebastidae

Neosebastes pandus, HUMZ 33214, 192.3 mm

Maxillicosta raoulensis, HUMZ 110724, 67.2 mm

Scorpaenidae

Pontinus macrocephalus, HUMZ 63115, 180.3 mm

Neomerinthe rufescens, BPBM 23893, 80.6 mm

Phenacoscorpius megalops, CAS 47299, 77.2 mm

Parascorpaena aurita, CAS 54038, 77.4 mm

Scorpaena neglecta, HUMZ 65961, 146.6 mm

Iracundus signifer, BPBM 13767, 92.9 mm

Scorpaenopsis cirrhosa, HUMZ 48346, 175.1 mm

Scorpaenodes kelloggi, HUMZ 48608, 69.7 mm

Hoplosebastes armatus, HUMZ 37449, 92.6 mm

Pterois lunulata, HUMZ uncatalogued, 141.0 mm

Ebosia bleekeri, HUMZ 37431, 111.7 mm

Brachypterois serrulatus, HUMZ 35083, 81.0 mm

Dendrochirus zebra, HUMZ 96496, 134.2 mm

Parapterois heterurus, HUMZ 35091, 103.8 mm

Rhinopias frondosa, KUSHIMOTO 7-058, 127.4 mm

Taenianotus triacanthus, BPBM 13800, 57.1 mm

Apistidae

Apistus carinatus, HUMZ 71706, 114.0 mm, HUMZ 110443, 102.7 mm

Tetrarogidae

Gymnapistes marmoratus, LACM-V 67-141-1, 89.5 mm

Centropogon australis, LACM 30823-8, 51.7 mm

Notesthes robusta, LACM 42623-6, 74.4 mm

Neocentropogon aeglefinus japonicus, HUMZ 74745, 89.7 mm

Ocosia fasciata, BSKU 4960, 86.3 mm

Paracentropogon longispinis, LACM 35978-5, 65.1mm

Hypodytes rubripinnis, HUMZ 36445, 71.0 mm, HUMZ 109270, 69.5mm

Liocranium pleurostigma, HUMZ 64246, 82.1mm

Ablabys taenianotus, FSFL uncatalogued, 94.2 mm

Richardsonichthys leucogaster, NSMT-P uncatalogued, 61.3 mm

Synanceiidae

Inimicus japonicus, HUMZ 49017, 188.6 mm

Synanceia verrucosa, HUMZ 105128, 223.5 mm

Erosa erosa, HUMZ 97727, 94.6 mm
Choridactylus multibarbus, CAS 33951, 69.5 mm
Minous monodactylus, HUMZ 39758, 84.2 mm, HUMZ 101862, 93.7 mm
Congiopodidae,
Congiopodus coriaceus, HUMZ 91198, 155.6 mm
Alertichthys blacki, HUMZ 66620, 173.6 mm
Zanclorhynchus spinifer, HUMZ 73652, 168.0 mm
Gnathanacanthidae
Gnathanacanthus goetzeei, AMS-IB 668, 158.1 mm
Aploactinidae
Aploactis aspera, HUMZ 74746, 51.9 mm
Erisphex potti, HUMZ 65922, 88.6 mm
Sthenopus mollis, NSMT-P uncatalogued, 54.2 mm
Pataecidae
Aetapcus vincenti, SAMA-F 652, 126.5 mm
Pataecus fronts, SAMA-F 1541, 60.9 mm
Neopataecus waterhousii, SAMA-F 2369, 70.2 mm

Scorpaenoids were grouped for respective characters. The groups are numbered in the same order as the character descriptions, as: 'consecutive number' - 'grade of derivation beginning from 0'. Following the subsequent determination of character polarity reversal of a character is expressed as 'R' for its grade of derivation. The character number corresponds to the group number, although the first as grade of derivation is omitted unless at least two grades were recognized. The name given for each taxon throughout this work is in accordance with the classification proposed here. Terminology follows Winterbottom (1974a) for myology and recent ichthyological works (Weitzman 1962, Nelson 1973, Patterson 1975, etc.) for osteology unless denoted. Scale bars in figures indicate 10 mm unless otherwise indicated.

Abbreviations used in the figures:
Muscles of the cheek
a1, a1 section of adductor mandibulae; a23, a23 section of adductor mandibulae; aw, aw section of adductor mandibulae; lap, levator arcus palatini; aap, adductor arcus palatini; do, dilatator operculi; lo, levator operculi.
Muscles of the ventral surface of the head
im, intermandibularis; prhy, protractor hyoidei; hin, hyohyoides inferioris; haba,

hyohyoides abductores anterior; habp, hyohyoides abductores posterior; had, hyohyoides adductores,

Muscles serving the branchial arches

lext, levator externus; lint, levator internus; lpost, levator posterior; obld, obliquus dorsalis; oblp, obliquus posterior; ad, adductor; trda, transversus dorsalis anterior; trdp, transversus dorsalis posterior; rdors, retractor dorsalis; spho, sphincter oesophagi; oblv, obliquus ventralis; trva, transversus ventralis anterior; trvp, transversus ventralis posterior; rctv, rectus ventralis; rcomm, rectus communis.

Muscles between the pectoral girdle, neurocranium, hyoid, and branchial arches

sth, sternohyoideus; phce, pharyngocleithralis externus; phci, pharyngocleithralis internus; prp, protractor pectoralis; lpect, levator pectoralis.

Muscles serving the pectoral fin

abs, abductor superficialis; abp, abductor profundus; arrv, arrector ventralis; ads, adductor superficialis; adp, adductor profundus; arrd, arrector dorsalis; adr, adductor radialis; cr, coracoradialis.

Muscles serving the pelvic fin

absp, abductor superficialis pelvicus; abpp, abductor profundus pelvicus; arrvp, arrector ventralis pelvicus; adsp, adductor superficialis pelvicus; adpp, adductor profundus pelvicus;arrdp, arrector dorsalis pelvicus; extp, extensor proprius.

Muscles of the dorsal and anal fins

erecd, erector dorsalis; deprd, depressor dorsalis; incld, inclinator dorsalis; ereca, erector analis; depra, depressor analis; incla, inclinator analis.

Carinal muscles

scara, supracarinalis anterior; scarm, supracarinalis medius; scarp, supracarinalis posterior; icara, infracarinalis anterior; icarm, infracarinalis medius; icarp, infracarinalis posterior.

Muscles serving the caudal fin

int, interradialis; hl, hypochordal longitudinalis; fd, flexor dorsalis; fds, flexor dorsalis superior; fv, flexor ventralis; fvi, flexor ventralis inferior; fve, flexor ventralis externus; add, adductor dorsalis.

Body muscles

epax, epaxialis; hyp, hypaxialis; obls, obliquus superioris; obli, obliquus inferioris.

Swimbladder and associated muscles

extr, extrinsic; intr, intrinsic; Bl, Baudelot's ligament.

Neurocranium

EC, ethmoid cartilage; E, ethmoid; LE, lateral ethmoid; PV, prevomer; PTS, pterosphenoid;

BS, basisphenoid; F, frontal; SP, sphenotic; PTO, pterotic; PO, prootic; EO, epiotic; EOC, exoccipital; SOC, supraoccipital; P, parietal; IC, intercalar; ST, supratemporal; BOC, basioccipital; PS, parasphenoid.

Nasal and circumorbital bones

N, nasal; L, lachrymal; IO, infraorbital; DS, dermosphenotic.

Jaws

PM, premaxillary; M, maxillary; D, dentary; AN, angular; RA, retroarticular.

Suspensorium

PL, palatine; Q, quadrate; MTP, metapterygoid; ECP, ectopterygoid; ENP, entopterygoid; HM, hyomandibular; SY, symplectic; POP, preopercle; OP, opercle; SOP, subopercle; IOP, interopercle.

Hyoid arch

IH, interhyal; EH, epihyal; CH, ceratohyal; HH, hypohyal; BH, basihyal; UH, urohyal; BR, branchiostegal ray.

Branchial arches

PB, pharyngobranchial; UP, upper pharyngeal; INARC, interarcual cartilage; EB, epibranchial; CB, ceratobranchial; HB, hypobranchial; BB, basibranchial; LP, lower pharyngeal.

Vertebrae

AV, abdominal vertebra; CV, caudal vertebra; NS, neural spine; HS, hemal spine; INS, interneural space; PR, pleural rib; EP, epipleural.

Caudal skeleton

CF, caudal fin; PV1, preural vertebra 1; US, urostyle; UN, uroneural; EU, epural; PHU, parhypural; HUA, hypurapophysis; HU, hypural.

Pectoral girdle

PT, posttemporal; SCL, supracleithrum; CL, cleithrum; PCL, postcleithrum; S, scapula; CO, coracoid; R, radial; P1F, pectoral fin.

Pelvic girdle

P2S, pelvis; P2F, pelvic fin.

Pterygiophore

SN, supraneural; DP, distal pterygiophore; MP, median pterygiophore; PP, proximal pterygiophore; STY, stay; DF, dorsal fin; AF, anal fin.

Alphabetically, abbreviations are:

Myology

a1, a1 section of adductor mandibulae; a23, a23 section of adductor mandibulae; aap,

adductor arcus palatini; abp, abductor profundus; abpp, abductor profundus pelvicus; abs, abductor superficialis; absp, abductor superficialis pelvicus; ad, adductor; add, adductor dorsalis; adp, adductor profundus; adpp, adductor profundus pelvicus; adr, adductor radialis; ads, adductor superficialis; adsp, adductor superficialis pelvicus; arrd, arrector dorsalis; arrdp, arrector dorsalis pelvicus; arrv, arrector ventralis; arrvp, arrector ventralis pelvicus; aw, aw section of adductor mandibulae; Bl, Baudelot's ligament; cr, coracoradialis; depra, depressor analis; deprd, depressor dorsalis; do, dilatator operculi; epax, epaxialis; ereca, erector analis; erecd, erector dorsalis; extp, extensor proprius; extr, extrinsic; fd, flexor dorsalis; fds, flexor dorsalis superior; fv, flexor ventralis; fve, flexor ventralis externus; fvi, flexor ventralis inferior; haba, hyohyoides abductores anterior; habp, hyohyoides abductores posterior; had, hyohyoides adductores; hin, hyohyoides inferioris; hl, hypochordal longitudinalis; hyp, hypaxialis; icara, infracarinalis anterior; icarm, infracarinalis medius; icarp, infracarinalis posterior; im, intermandibularis; incla, inclinator analis; incld, inclinator dorsalis; int, interradialis; intr, intrinsic; lap, levator arcus palatini; lext, levator externus; lint, levator internus; lo, levator operculi; lpect, levator pectoralis; lpost, levator posterior; obld, obliquus dorsalis; obli, obliquus inferioris; oblp, obliquus posterior; obls, obliquus superioris; oblv, obliquus ventralis; phce, pharyngocleithralis externus; phci, pharyngocleithralis internus; prhy, protractor hyoidei; prp, protractor pectoralis; rcomm, rectus communis; rctv, rectus ventralis; rdors, retractor dorsalis; scara, supracarinalis anterior; scarm, supracarinalis medius; scarp, supracarinalis posterior; spho, sphincter oesophagi; sth, sternohyoideus; trda, transversus dorsalis anterior; trdp, transversus dorsalis posterior; trva, transversus ventralis anterior; trvp, transversus ventralis posterior.

Osteology

AF, anal fin; AN, angular; AV, abdominal vertebra; BB, basibranchial; BH, basihyal; BOC, basioccipital; BR, branchiostegal ray; BS, basisphenoid; CB, ceratobranchial; CF, caudal fin; CH, ceratohyal; CL, cleithrum; CO, coracoid; CV, caudal vertebra; D, dentary; DF, dorsal fin; DP, distal pterygiophore; DS, dermosphenotic; E, ethmoid; EB, epibranchial; EC, ethmoid cartilage; ECP, ectopterygoid; EH, epihyal; ENP, entopterygoid; EO, epiotic; EOC, exoccipital; EP, epipleural; EU, epural; F, frontal; HB, hypobranchial; HH, hypohyal; HM, hyomandibular; HS, hemal spine; HU, hypural; HUA, hypurapophysis; IC, intercalar; IH, interhyal; INARC, interarcual cartilage; INS, interneural space; IO, infraorbital; IOP, interopercle; L, lachrymal; LE, lateral ethmoid; LP, lower pharyngeal; M, maxillary; MP, median pterygiophore; MTP, metapterygoid; N, nasal; NS, neural spine; OP, opercle; P, parietal; P1F, pectoral fin; P2F, pelvic fin; P2S. pelvis; PB, pharyngobranchial; PCL, postcleithrum; PHU, parhypural; PL, palatine; PM, premaxillary; PO, protic; POP,

preopercle; PP, proximal pterygiophore; PR, pleural rib; PS, parasphenoid; PT, posttemporal; RTO, pterotic; PTS, pterosphenoid; PV, prevomer; PV1, preural vertebra 1; Q, quadrate; R, radial; RA, retroarticular; S, scapula; SCL, supracleithrum; SN, supraneural; SOC, supraoccipital; SOP, subopercle; SP, sphenotic; ST, supratemporal; STY, stay; SY, symplectic; UH, urohyal; UN, uroneural; UP, upper pharyngeal; US, urostyle.

II. Myology

1. MUSCLES OF THE CHEEK (Figs. 1–5; Table 1)

The following five muscles serve the cheek: the adductor mandibulae, levator arcus palatini, addutor arcus palatini, dilatator operculi, and levator operculi.

Adductor mandibulae: The adductor mandibulae is composed of three sections: a1, a23, and aw.

Section a1: A1 is separated from a23 by the path of ramus mandibularis 5. A1 overlaps a23 posteriorly. A1 and a23 are joined to aw by an aponeurosis. A1 is connected with a primordial ligament anteroventrally, forming the maxillary tendon that is inserted high on the posterodorsal face of the maxillary head. In most scorpaenoids (group 1-0), a1 does not taper posteriorly, having its origin from the anterior face of the upper portion of the

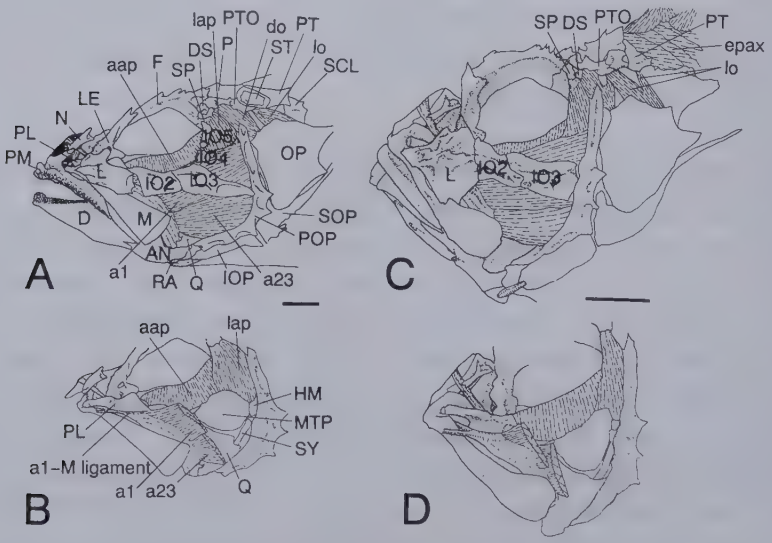


Fig. 1. Lateral view of head: A and B, *Adelosebastes latens*; C and D, *Dendrochirus zebra*. A and C, superficial muscles and bones; B and D,after removal of a1 and a23.

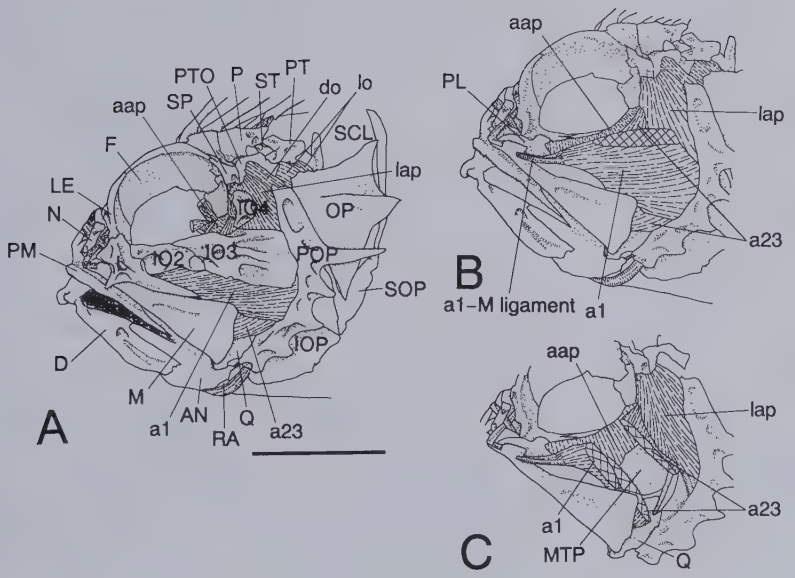


Fig. 2. Lateral view of head of *Richardsonichthys leucogaster*. A, superficial muscles and bones; B, after removal of infraorbitals; C, after removal of a1 and a23.

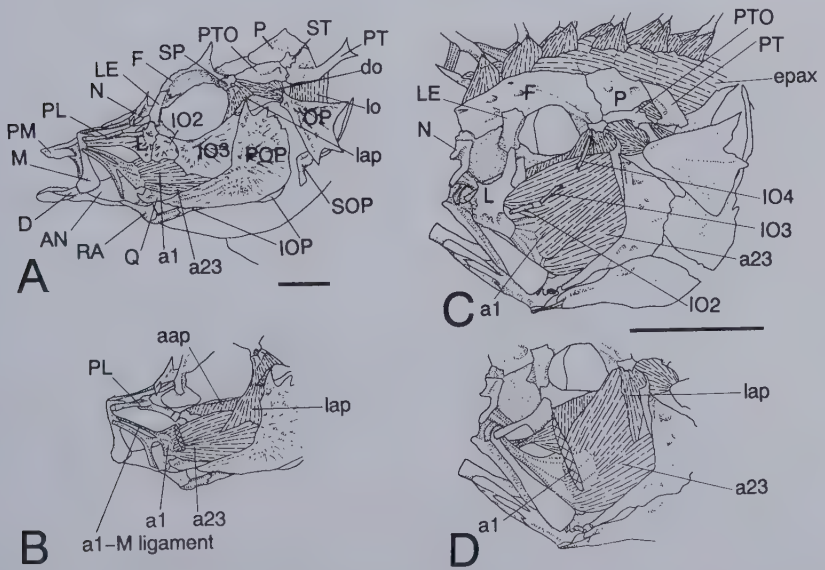


Fig. 3. Lateral view of head: A and B, *Zanclorhynchus spinifer*; C and D, *Neopatacus waterhousii*. A and C, superficial muscles and bones; B and D, after removal of a1 and a23.

preopercle and the face of the lateral process of the hyomandibular by an aponeurosis (Figs. 1A, C, 2A, 3A); in pataecids (group 1-1), a1 is narrow posteriorly, the origin including only the anterior face of the lateral process of the hyomandibular (Fig. 3C). In sebastids, setarchids, neosebastids, scorpaenids, synanceiids, congiopodids, the gnathanacanthid, the aploactinids *Erisphex* and *Sthenopus*, and pataecids (group 2-0), the a1 fibers have no association with the infraorbitals, in the apistid, tetrarogids, and the aploactinid *Aploactis* (group 2-1), the dorsolateral portion of the a1 origin is on the medial face of infraorbital 3 (Fig. 2B). In most scorpaenoids (group 3-0), the a1 fibers extend well forward along the primordial ligament between the lower jaw and the maxilla, the maxillary tendon of a1 consequently being short (Figs. 1D, 2B, 3D); in sebastids and congiopodids (group 3-1), the a1 fibers do not extend so far forward anteriorly, the maxillary tendon therefore being long (Figs. 1B, 3A, B). In most scorpaenoids (group 4-0), the maxillary tendon branches into two anteriorly, one branch leading to a small process on the anteromedial face of the maxillary head and the other, to a small process on the anterolateral surface of the maxillary (Figs. 1B, 1D, 2B, 3B); in pataecids (group 4-1), the maxillary tendon branches into three anteriorly, two branches resembling those of group 4-0 and the third leading to the anteromedial face of the maxillary just posterior to the anteromedial process (Fig. 3D).

Section a23: A23 lies ventrally to a1, its components, a2 and a3 being united into a single muscle mass in all scorpaenoids. In sebastids, setarchids, neosebastids, and scorpaenids (group 5-0), the origin, which includes the lateral faces of the metapterygoid and symplectic, dorsolateral face of the quadrate and anterolateral face of the preopercle, lies ventrally to the levator arcus palatini and is not overlain by the ventral part of the levator arcus palatini (Fig. 1B, D); in the apistid, synanceiids, congiopodids, the gnathanacanthid, and the aploactinids *Erisphex* and *Sthenopus* (group 5-1), the posterior part of a23 branches into two muscle masses, sandwiching the ventral part of the levator arcus palatini (Fig. 3B); in tetrarogids and the aploactinid *Aploactis* (group 5-2), the posterior part of a23 lies medially to the well developed levator arcus palatini, the muscle originating not only from the lateral face of the hyomandibular but also from the posterodorsal face of the metapterygoid and dorsolateral face of the symplectic (Fig. 2B, C); in pataecids (group 5-3), the origin includes the neurocranium, that is, the dorsolateral face of the pterosphenoid and anteroventral face of the sphenotic in *Pataecus* and *Aetapcus*, but the dorsolateral face of the pterosphenoid only in *Neopataecus* (Fig. 3D).

Section aw: The origin of aw is tendinous from the medial face of the preopercle. Its insertion is on the medial face of the dentary. The fibers fill the Meckelian fossa (Fig. 5A-E).

Levator arcus palatini (lap): The levator arcus palatini is a bulging muscle, narrowed at each end, with vertically running fibers. Its origin is from the ventrolateral face of the

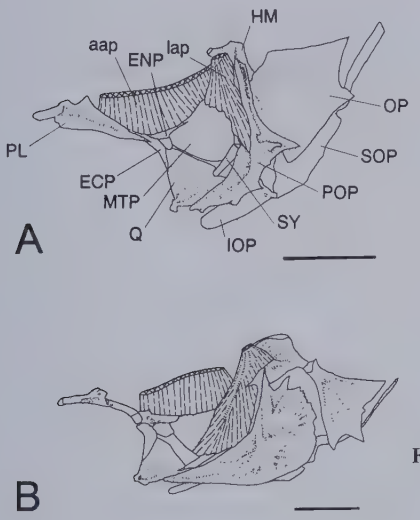


Fig. 4. Lateral view of suspensorium and associated muscles: A, *Neomerinthe rufescens*; B, *Zanclorhynchus spinifer*.

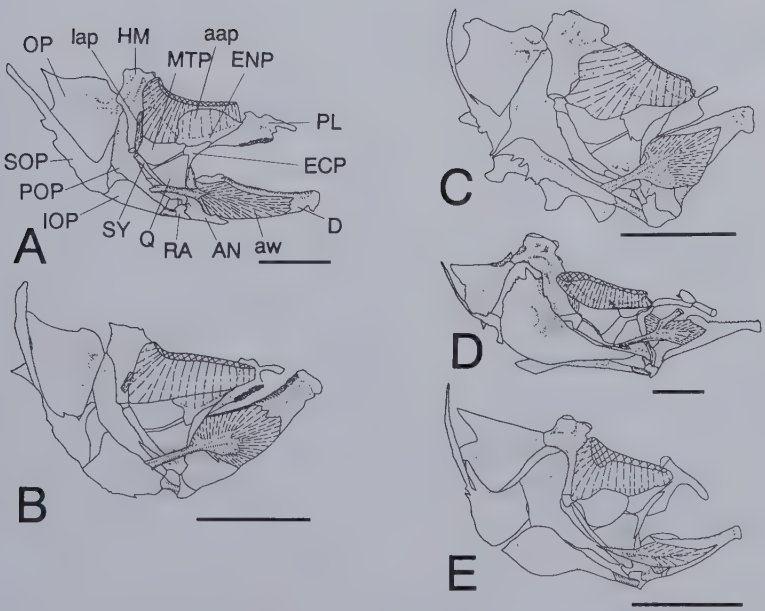


Fig. 5. Medial view of suspensorium and associated muscles: A, *Neomerinthe rufescens*; B, *Richardsonichthys leucogaster*; C, *Erosa erosa*; D, *Zanclorhynchus spinifer*; E, *Neopataecus waterhousii*.

sphenotic. In most scorpaenoids (group 6-0), the insertion is on the lateral face of the hyomandibular and dorsolateral margin of the metapterygoid (Figs. 1B, D, 2C, 4A); in the congiopodids *Congiopodus* and *Zanclorhynchus* (group 6-1), the fibers extend to the posteroventral face of the metapterygoid and the dorsal face of the symplectic (Fig. 4B).

Adductor arcus palatini (aap): The adductor arcus palatini is a plate-shaped muscle between the neurocranium and palatal arch, forming the floor of the orbit. It originates from the ventrolateral face of the parasphenoid and the anterolateral face of the prootic, and is inserted on the posterodorsal face of the palatine and entopterygoid. In sebastids, setarchids, neosebastids, and scorpaenids (group 7-0), the muscle insertion covers most of the dorsolateral face of the broad entopterygoid (Fig. 5A); in the apistid, tetrarogids, the synanceiids *Inimicus* and *Choridactylus*, and the aploactinid *Sthenopus* (group 7-1), the insertion covers less than half of the dorsolateral face of the crescent-shaped entopterygoid (Fig. 5B); in the synanceiid *Minous*, the congiopodids *Congiopodus* and *Alertichthys*, the gnathanacanthid, the aploactinids *Aploactis* and *Erisphex*, and pataecids (group 7-2), insertion is on the dorsal margin or dorsomedial face of the crescent-shaped entopterygoid (Fig. 5E); and in the synanceiids *Synanceia* and *Erosa*, and the congiopodid *Zanclorhynchus* (group 7-3), on a longitudinal ridge on the medial face of the entopterygoid (Fig. 5C, D).

Dilatator operculi (do): The dilatator operculi, a thin, plate-shaped muscle between theopercle and the neurocranium, originates from the longitudinal groove of the sphenotic and pterotic, and is inserted on the anterodorsal margin of the opercle.

Levator operculi (lo): The levator operculi is a plate-shaped muscle posterior to the dilatator operculi. Its origin varies in scorpaenoids. In sebastids, setarchids, neosebastids, the scorpaenids *Pontinus, Neomerinthe, Phenacoscorpius, Parascorpaena, Scorpaena, Iracundus, Scorpaenopsis, Scorpaenodes, Hoplosebastes, Rhinopias*, and *Taenianotus*, the gnathanacanthid, and pataecids (group 8-0), the origin is from the ventrolateral face of the pterotic (Figs. 1A, 3C); in the scorpaenids *Pterois, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus*, and *Parapterois*, the apistid, tetrarogids, synanceiids, the congiopodid *Alertichthys*, and aploactinids (group 8-1), the muscle originates from two branches, one from the ventrolateral face of the pterotic and the other from the ventral face of the posttemporal (Figs. 1C, 2A); in the congiopodids *Congiopodus* and *Zanclorhynchus* (group 8-2), it originates from the ventral face of the posttemporal and is inserted on the dorsomedial face of the opercle (Fig. 3A).

Table 1. Comparison of cheek muscle characters in scorpaenoids. Nemerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	A1 origin	A1 and infraorbital 3	A1-maxillary tendon	A1 maxillary tendon	A23 origin	Lavator arcus palatini insertion	Adductor arcus palatimi insertion	Levator operculi origin
Sebastidae	broad (1-0)	not associated (2-1)	long (3-1)	bifid (4-0)	lateral to levator arcus palatini (lap) (5-0)	not including symplectic (6-0)	overlaps most of entopterygoid dorsolaterally (7-0)	pterotic (8-0)
Setarchidae Neosebastidae Scorpaenidae *Pontinus* *Neomerinthe* *Phenacoscorpius* *Parascorpaena* *Scorpaena* *Iracundus* *Scorpaenopsis* *Scorpaenodes* *Hoplosebastes* *Rhinopias* *Taenianotus*								
Scorpaenidae *Pterois* *Ebosia* *Brachypterois* *Dendrochirus* *Parapterois*			short (3-0)					pterotic and posttempoal (8-1)
Apistidae		associated (2-1)			sandwiching lap (5-1)		overlaps less than half of entopterygoid dorsolaterally (7-1)	
Tetrarogidae					medial to lap (5-2)			
Synanceiidae *Inimicus* *Choridactylus* Aploactinidae *Sthenopus*		not associated (2-0)			sandwiching lap (5-1)			
Synanceiidae *Synanceia* *Erosa*							medial ridge of entopterygoid (7-3)	
Synanceiidae *Minous* Aploactinidae *Erisphex*							dorsal margin of dorsomedial face of entoptery-goid (7-2)	
Congiopodidae *Congiopodus*			long (3-1)			including symplectic (6-1)		posttemporal (8-2)
Congiopodidae *Alertichthys*						not including symplectic (6-0)		pterotic and posttemporal (8-1)
Congiopodidae *Zanclorhynchus*						including symplectic (6-1)	medial ridge of entoptery-goid (7-3)	posttemporal (8-2)
Gnathanacanthidae			short (3-0)			not including symplectic (6-0)	dorsal margin or dorsomedial face of entoptery-goid (7-2)	pterotic (8-0)
Aploactinidae *Aploactis*		associated (2-1)			medial to lap (5-2)			
Pataecidae	narrow (1-1)	not associated (2-0)		trifid (4-1)	neuro-cranium (5-3)			

2. MUSCLES OF THE VENTRAL SURFACE OF THE HEAD (Figs. 6-8; Table 2)

The following five muscles serve the ventral surface of the head: the intermandibularis, protractor hyoidei, hyohyoides inferioris, hyohyoidei abductores, and hyohyoidei adductores.

Intermandibularis (imd): The intermandibularis is an unpaired muscle between the anteromedial faces of the dentaries, just behind the symphysis. In scorpaenoids, this muscle is sandwiched between the dorsal and ventral branches of the tendinous insertion of the protractor hyoidei.

Protractor hyoidei (prhy): The protractor hyoidei, a large muscle below the mandible bones, is subdivided by two myosepta. The anterior attachment behind the symphysis is divided into dorsal and ventral branches, which sandwich the intermandibularis. The posterior attachment is on the ventral face of the ceratohyal. In sebastids, setarchids, neosebastids, scorpaenids, the apistid, tetrarogids, and synanceiids (group 9-0), the posterior attachment is anterior to the base of the fourth branchiostegal ray (Fig. 6); in the congiopodids *Alertichthys* and *Zanclorhynchus*, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 9-1); in the congiopodid *Congiopodus* (group 9-2), it is anterior to the bases of the third and second branchiostegal rays respectively.

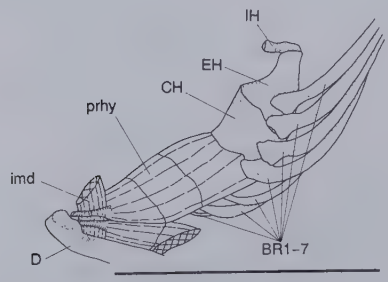


Fig. 6. Ventral view of ventral muscles of hyoid arch of *Centropogon ausralis*.

Hyohyoides inferioris (hin): The hyohyoides inferioris lies anteriorly to the hyohyoidei abductores, the fibers of the two muscles running in parallel. The hyohyoides inferioris lies dorsally to the bases of the anterior three branchiostegal rays, with its insertion on the medial face of the ceratohyal near the base of the fourth branchiostegal ray. In sebastids, scorpaenids, tetrarogids except *Ablabys* and *Richardsonichthys*, and the gnathanacanthid (group 10-0), the left and right fiber bundles cross over each other, with the element from the right ventral hypohyal being ventral to the other (Fig. 7A); in the tetrarogids *Ablabys* and *Richardsonichthys*, synanceiids, aploactinids, and pataecids (group 10-1), the left and

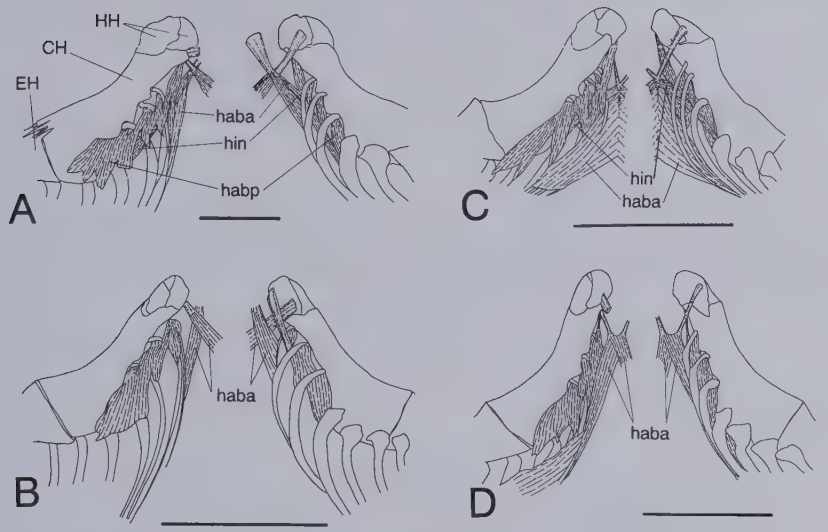


Fig. 7. Muscles of hyoid arch: A, *Rhinopias frondosa*; B, *Maxillicosta raoulensis*; C, *Richardsonichthys leucogaster*; D, *Apistus carinatus*. A and B, dorsal view; C and D, ventral view.

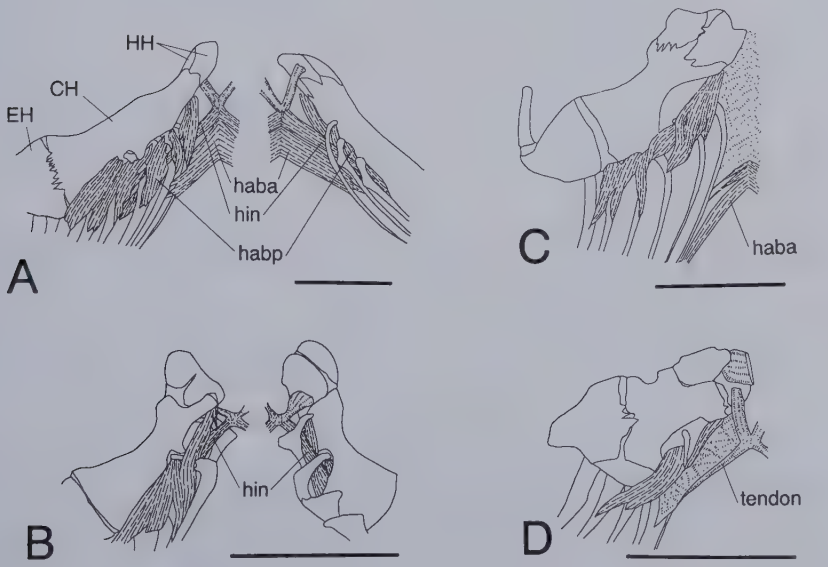


Fig. 8. Muscle of the hyoid arch: A, *Erosa erosa*; B, *Erisphex potti*; C, *Zanclorhynchus spinifer*; D, *Congiopodus coriaceus*. Left figures of A and B, C, and D, dorsal view; right of A and B, ventral view.

right origins are tendinous and meet in the midline, from which point the fiber bundles arise (Figs. 7C, 8A, B); in setarchids, neosebastids, the apistid, and congiopodids (group 10-2), the hyohyoides inferioris is absent (Figs. 7B, D, 8C, D).

Hyohyoidei abductores: The hyohyoidei abductores lie between the hypohyal and branchiostegal rays, and between the proximal portions of the branchiostegal rays, there being two sections, anterior and posterior.

The hyohyoidei abductores anterior (**haba**) originates from the ventral face of the ventral hypohyal, and is inserted on the branchiostegal rays of the opposite side. The fibers of this muscle run parallel to those of the hyohyoides inferioris, if present. In sebastids, setarchids, neosebastids, scorpaenids except *Taenianotus*, tetrarogids except *Ablabys* and *Richardsonichthys*, and the gnathanacanthid (group 11-0), the left and right fiber bundles cross over between the first branchiostegal rays, the element from the right ventral hypohyal to the left branchiostegal rays being ventral to the other (Fig. 7A, B); in the apistid (group 11-1), the left and right elements meet in the midline giving rise posteriorly to muscle bundles, the fibers from the right side to the left branchiostegal rays being ventral to those from the left side (Fig. 7D); in the scorpaenid *Taenianotus*, the tetrarogids *Ablabys* and *Richardsonichthys*, synanceiids, the congiopodids *Alertichthys* and *Zanclorhynchus*, and pataecids (group 11-2), the left and right elements meet in the midline, the fibers from each side being in broad contact (Figs. 7C, 8A, C); in the congiopodid *Congiopodus* (group 11-3), muscle fibers are absent, with only a pair of tendons extending from the ventral midline to the medial surfaces of the first branchiostegal rays (Fig. 8D); in aploactinids (group 11-4), the hyohyoidei abductores anterior are entirely absent (Fig. 8B).

The origin of the hyohyoidei abductores posterior (**habp**) is from the ventrolateral face of the ceratohyal, being dorsal to the insertion of the hyohyoides inferioris, and its insertion, on the branchiostegal rays of the same side.

Hyohyoidei adductores (had): The hyohyoidei adductores are thin muscles with sparse fibers, lying between the distal portions of the branchiostegal rays, and between the posteriormost branchiostegal ray and the medial face of the subopercle and opercle.

3. MUSCLES SERVING THE BRANCHIAL ARCHES (Figs. 9-12; Table 3)

The following eight muscles serve the dorsal parts of the branchial arches: the levator externus, levator internus, levator posterior, obliquus dorsalis, obliquus posterior, adductores, transversus dorsalis, and retractor dorsalis.

Levator externus (lext): The levatores externi comprise three or four muscles, connecting the epibranchials with the neurocranium. Their origins are from the

Table. 2. Comparison of characters of muscles serving the ventral head surface in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Posterior margin of protractor hyoidei	Hyohyoides inferioris	Anterior section of hyohyoidei abductores
Sebastidae Scorpaenidae except *Taenianotus* Tetraogidae except *Ablabys* and *Richardsonichthys*	base of 4th branchiostegal ray (9-0)	fiber bundles of left and right pairs cross over each other (10-0)	fiber bundles of left and right pair cross over each other (11-0)
Gnathanacanthidae	base of 3rd branchiostegal ray (9-1)		
Scorpaenidae *Taenianotus*	base of 4th branchiostegal ray (9-0)		tendinous origins meet in the midline at which point fibers form a raphé (11-2)
Tetrarogidae *Ablabys* *Richardsonichthys* Synanceiidae		left and right pairs of tendinous origins meet in the midline at which point fiber bundles arise (10-1)	
Pataecidae	base of 3rd branchiostegal ray (9-1)		
Aploactinidae			entirely absent (11-4)
Setarchidae Neosebastidae	base of 4th branchiostegal ray (9-0)	absent (10 2)	fiber bundles of left and right pairs cross over each other (11-0)
Apistidae			tendinous origins meet in the midline at which point fiber bundles arise (11-1)
Congiopodidae *Alertichthys* *Zanclorhynchus*	base of 3rd branchiostegal ray (9-1)		tendinous origins meet in the midline at which point fibers form a raphé (11-2)
Congiopodidae *Congiopodus*	base of 2nd branchiostegal ray (9-2)		fibers are absent, a pair of tendons remain (11-3)

dorsolateral face of the prootic or the ventrolateral face of the pterotic, with insertions on the dorsolateral faces of the epibranchials of the same arch near their articulation with the ceratobranchials. Levator externus 3, if present, is the least developed among these muscles, levator externus 4 usually being the most developed. Sebastids, setarchids, the neosebastid *Maxillicosta*, scorpaenids, the apistid, tetrarogids except *Liocranium* and *Richardsonichthys*, the synanceiids *Choridactylus* and *Minous*, congiopodids, and the gnathanacanthid (group 12-0) have levatores externi 1 to 4 (Figs. 9A, B, 10A-C, F), but the neosebastid *Neosebastes*, the tetrarogids *Liocranium* and *Richardsonichthys*, the

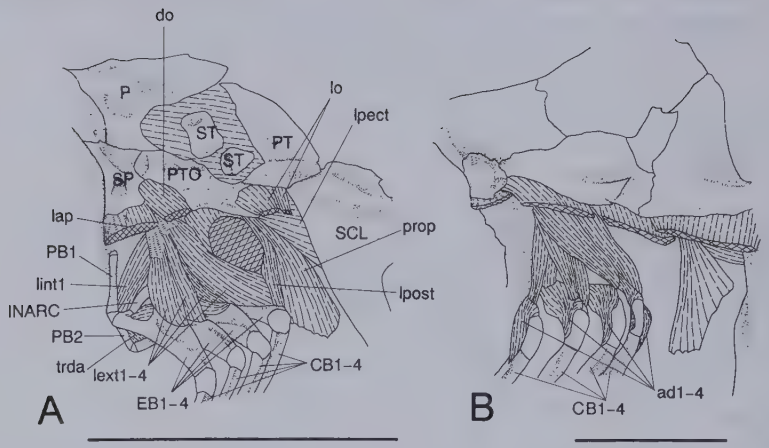


Fig.9. Left lateral view of dorsal branchial arch muscles: A, *Ocosia fasciata*; B, *Zanclorhynchus spinifer*.

synanceiids *Inimicus*, *Synanceia*, and *Erosa*, aploactinids, and pataecids (group 12-1) lack levator externus 3 (Fig. 10D, E).

Levator internus (lint): The levatores interni comprise two muscles, levatores interni 2 and 3, originating from the prootic, just medially to levatores externi, and connecting the neurocranium with the pharyngobranchials. The insertion of levator internus 2 is on the dorsal face of pharyngobranchial 2 or the complex of pharyngobranchials 2 and 3, and the upper pharyngeal, and that of levator internus 3, on the dorsal face of pharyngobranchial 3 or the complex of pharyngobranchials 2 and 3, and the upper pharyngeal.

Levator posterior (lpost): The levator posterior is a small, slender muscle, originating from the dorsolateral face of the prootic or the ventrolateral face of the pterotic, and having its insertion on the dorsal face of the upper pharyngeal just posteriorly to that of levator externus 4. Although most scorpaenoids (group 13-0) have this muscle (Fig. 10A-E), it is absent in congiopodids (group 13-1)(Figs. 9B, 10F).

Obliquus dorsalis (obld): The obliqui dorsales connect the epibranchials with the pharyngobranchials of the same arch. Most scorpaenoids (group 14-0) have only obliquus dorsalis 3, connecting the dorsal faces of pharyngobranchial 3 and the articulation of epibranchials 3 and 4 (Fig. 10B-E), but setarchids and the congiopodid *Zanclorhynchus* (group 14-1) also have obliqui dorsales 2 and 3, which connect the dorsal faces of pharyngobranchial 2 and epibranchial 2 (Fig. 10A, F). In most scorpaenoids (group 15-0), obliquus dorsalis 3 lies posteriorly to levator internus 3 (Fig. 10A-D, F); in the apistid, aploactinids, and pataecids (group 15-1), obliquus dorsalis 3 sandwiches levator internus 3

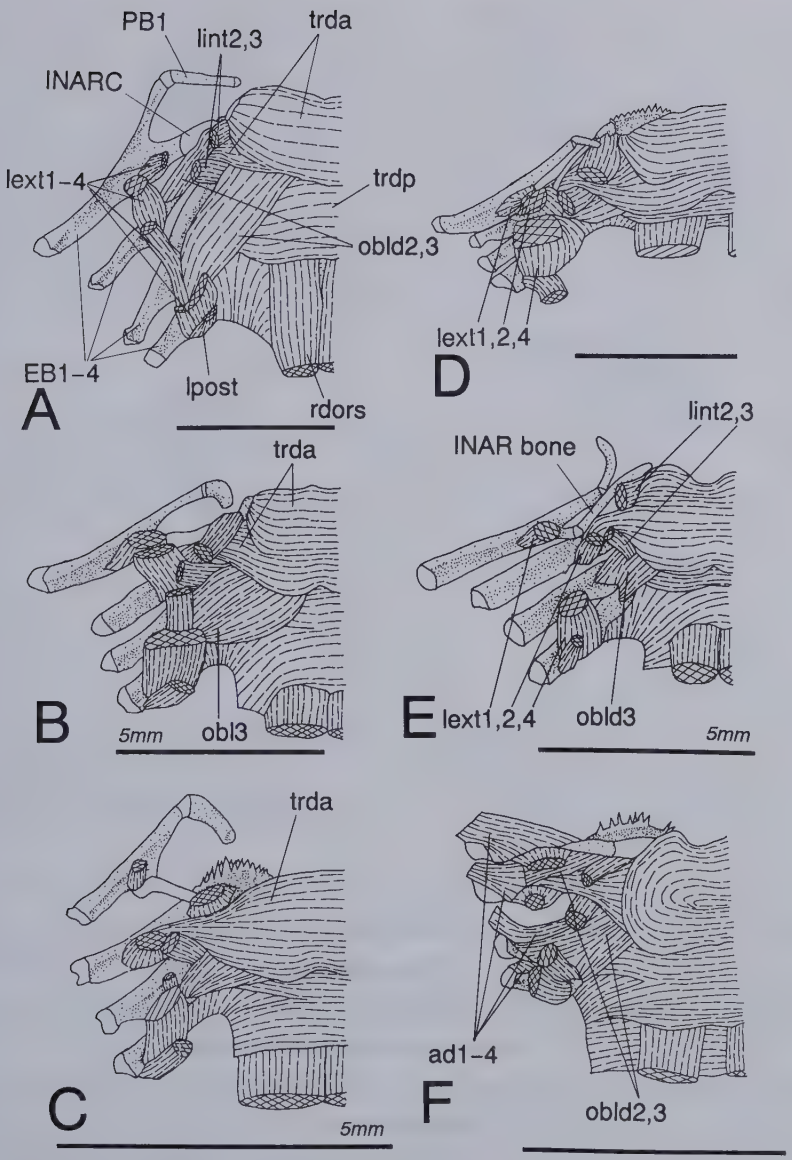


Fig. 10. Dorsal view of left side of dorsal branchial arch muscles: A, *Ectreposebastes imus*; B, *Ocosia fasciata*; C, *Centropogon australis*; D, *Erosa erosa*; E, *Erisphex potti*; F, *Zanclorhynchus spinifer*.

(Fig. 10E).

Obliquus posterior (oblp): The obliquus posterior is a small muscle, connecting the posterodorsal tip of the lower pharyngeal to the posteromedial face of epibranchial 4. This muscle lies medially to adductores 4 and 5, its fibers running parallel to those of the

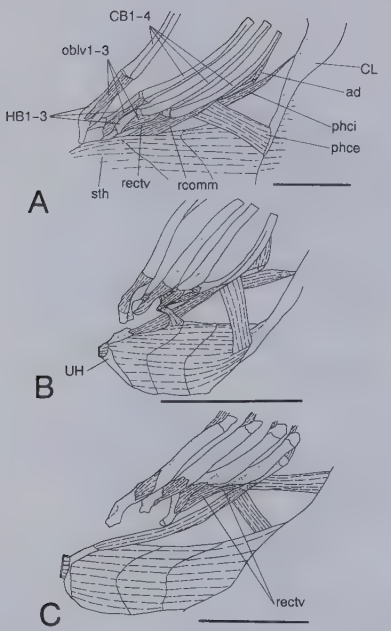


Fig. 11. Left lateral view of ventral branchial arch muscles: A, *Scorpaenodes kelloggi*; B, *Choridactylus multibarbus*; C, *Alertichthys blacki*.

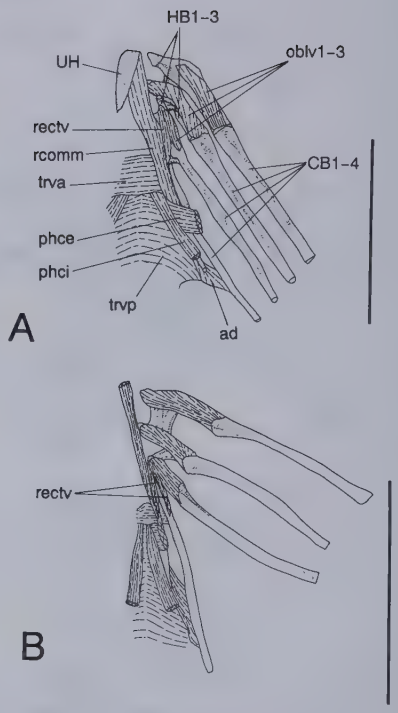


Fig. 12. Dorsal view of left side of ventral branchial arch muscles: A, *Scorpaenodes kelloggi*; B, *Taenianotus triacanthus*.

sphincter oesophagi.

Adductor (ad): The adductores interconnect the epibranchial and ceratobranchial or the ceratobranchial and lower pharyngeal. In most scorpaenoids (group 16-0), the adductores are composed of two muscles, adductor 4, interconnecting the medial face of epibranchial 4 and the posterodorsal tip of ceratobranchial 4 medially to the connection of the obliquus posterior, and adductor 5, interconnecting the posterolateral face of ceratobranchial 4 and the posterodorsal tip of the lower pharyngeal (Figs. 11A-C, 12A, B); in congiopodids (group 16-1), adductores 1 to 5 are present, 4 and 5 being the same as in group 16-0, and 1, 2, and 3 running from the posterolateral margins of the corresponding epibranchials to those of the articulated ceratobranchials (Figs. 9B, 10F).

Transversus dorsalis: The transversi dorsales are composed of two large muscles, the transversus dorsalis anterior and posterior. The fibers run transversely.

The origin of the transversus dorsalis anterior (**trda**) is a mid-dorsal raphé below the posteroventral face of the parasphenoid. In sebastids except *Plectrogenium*, setarchids,

neosebastids, scorpaenids, the tetrarogids *Neocentropogon, Ocosia, Hypodytes, Liocranium, Ablabys,* and *Richardsonichthys*, the synanceiids *Inimicus, Synanceia*, and *Erosa*, aploactinids, and pataecids (group 17-0), the insertion of the muscle is divided into two, one part usually being the anterodorsal tip of pharyngobranchial 2 or its complex with pharyngobranchial 3 and the upper pharyngeal, and the other being on the anterodorsal face of epibranchial 2 and sandwiched by levatores interni 2 and 3 (Fig. 10A, B, D, E); in the sebastid *Plectrogenium*, the apistid, the tetrarogids *Gymnapistes, Centropogon, Notesthes,* and *Paracentropogon*, the synanceiids *Choridactylus* and *Minous*, congiopodids, and the gnathanacanthid (group 17-1), the insertion is not branched, the latter part only being present (Fig. 10C, F).

The transversus dorsalis posterior (**trdp**) lies ventrally to the anterior part of obliquus dorsalis 3 and dorsally to the retractor dorsalis.

Retractor dorsalis (rdors): The retractor dorsalis connects the dorsal parts of the branchial arches to the vertebrae, the muscles of both sides lying closely parallel to each other. The muscle originates from the ventral face of the vertebrae, usually abdominal vertebrae 2 to 5, and is inserted on the dorsal faces of pharyngobranchial 3 and the upper pharyngeal or their complex.

The following five muscles serve the ventral parts of the branchial arches: the sphincter oesophagi, obliquus ventralis, transversus ventralis, rectus ventralis, and rectus communis.

Sphincter oesophagi (spho): The fibers of the sphincter oesophagi run around the oesophagus. The anterodorsal distinction of this muscle from the transversus dorsalis posterior was not clear.

Obliquus ventralis (oblv): The obliqui ventrales are composed of three muscles: obliqui ventrales 1, 2, and 3, originating from the anteroventral faces of hypobranchials 1-3, and being inserted on the anteroventral margins of the corresponding ceratobranchials.

Transversus ventralis: The transversi ventrales are composed of two muscles, the transversus ventralis anterior and posterior.

The transversus ventralis anterior (**trva**) spans the ventromedial face of ceratobranchial 4. This unpaired muscle lies dorsally to the rectus communis and ventrally to the origin of the pharyngocleithralis internus.

The transversus ventralis posterior (**trvp**) originates from the ventromedial face of the lower pharyngeal, the muscle lying dorsally to the pharyngocleithralis internus. The fibers run transversely, meeting on the midline raphé above the heart.

Rectus ventralis (rectv): The rectus ventralis lying between obliquus ventralis 3 and the rectus communis, originates from the anteroventral tip of hypobranchial 3, posterior to the origin of obliquus ventralis 3. In most scorpaenoids (group 18-0), the insertion of the

rectus ventralis is on the anteroventral face of ceratobranchial 4 (Figs. 11A, B, 12A); in the scorpaenids *Brachypterois* and *Taenianotus*, the synanceiid *Inimicus*, and congiopodids (group 18-1), the insertion of the muscle is branched being on the anteroventral faces of

Table 3. Comparison of branchial arch muscles characters in scorpaenoids. Numerals in paraentheses correspond to group numbers.

Taxon	Levator externus 3	Levator posterior	Obliquus dorsalis 2	Obliquus dorsalis 3 and levator internus 3	Adductores 1 to 3	Transversus dorsalis insertion	Rectus ventralis insertion
Sebastidae except *Plectrogenium* Neosebastidae *Maxillicosta* Scorpaenidae except *Brachyterois* and *Taenianotus* Tetrarogidae *Neocentropogen* *Ocosia* *Hypodytes* *Ablabys*	present (12-0)	present (13-0)	absent (14-0)	obliquus dorsalis 3 lying posteriorly to levator internus 3 (15-0)	absent (16-0)	branched into two (17-0)	unbranched (18-0)
Setarchidae			present (14-1)				
Scorpaenidae *Brachypterois* *Taenianotus*			absent (14-0)				branched into two (18-1)
Apistidae				obliquus dorsalis 3 sandwiching levator internus 3 (15-1)		unbranched (17-1)	unbranched (18-0)
Sebastidae *Plectrogenium* Tetrarogidae *Gymnapistes* *Centropogon* *Notesthes* *Paracentropogon* Synanceiidae *Choridactylus* *Minous* Gnathanacanthidae				obliquus dorsalis 3 lying posteriorly to levator internus 3 (15-0)			
Neosebastidae *Neosebastes* Tetrarogidae *Liocranium* *Richardsonichthys* Synanceiidae *Synanceia* *Erosa*	absent (12-1)					branched into two (17-0)	
Synanceiidae *Inimicus*							branched into two (18-1)
Aploactinidae Pataecidae				obliquus dorsalis 3 sandwiching levator internus 3 (15-1)			unbranched (18-0)
Congiopodidae *Congiopodus* *Alertichthys*	present (12-0)	absent (13-1)		obliquus dorsalis 3 lying posteriorly to levator internus 3 (15-0)	present (16-1)	unbranched (17-1)	branched into two (18-1)
Congiopodidae *Zanclorhynchus*			present (14-1)				

ceratobranchial 4 and the lower pharyngeal (Figs. 11C, 12B).

Rectus communis (rcomm): The origin of the rectus communis is from the posterodorsolateral face of the urohyal. The tendinous insertion is on the posteroventral face of the lower pharyngeal.

4. MUSCLES BETWEEN THE PECTORAL GIRDLE, NEUROCRANIUM, HYOID ARCH, AND BRANCHIAL ARCHES (Figs. 9, 11, 13, 14; Table 4)

There are six muscles between the pectoral girdle, neurocranium, hyoid, and branchial arches: the sternohyoideus, pharyngocleithralis externus, pharyngocleithralis internus, protractor pectoralis, levator pectoralis, and sternobranchialis.

Sternohyoideus (sth): The sternohyoideus is a large muscle, connecting the hyoid arch, branchial arch, and pectoral girdle. In most scorpaenoids, it originates from the anteroventral face of the cleithrum and anterior face of the obliquus inferioris, forming a myocomma. In congiopodids, the origin of the sternohyoideus is restricted to the anteroventral face of the cleithrum. The relationship between the sternohyoideus and pharyngocleithralis externus is mentioned in the description of the latter muscle (groups 19-0, 1, and 2). The sternohyoideus is inserted on the posteroventral face of the urohyal. The muscle comprises three myomeres. A tendon connects the dorsal face of the first myocomma and the anteroventral tip of hypobranchial 3.

Pharyngocleithralis externus (phce): Although WINTERBOTTOM (1974a) used the name pharyngoclavicularis, the muscle connecting the cleithrum with the lower pharyngeal is better termed pharyngocleithralis, following the current name of the bony element from which it originates.

The plate-shaped pharyngocleithralis externus, originating from the anteroventral face of the cleithrum, connects the branchial arch with the pectoral girdle as does the pharyngocleithralis internus. In sebastids, setarchids, neosebastids, scorpaenids, the apistid, tetrarogids, and the gnathanacanthid (group 19 0), the origin is lateral to the origin of the sternohyoideus (Figs. 11A, 13A - E); in synanceiids, the congiopodid *Congiopodus*, aploactinids, and pataecids (group 19-1), the origin is sandwiched by the origin of the sternohyoideus (Figs. 11B, 14B); in the congiopodids *Alertichthys* and *Zanclorhynchus* (group 19-2), the origin is dorsomedial to that of the sternohyoideus. The insertion of the pharyngocleithralis externus is on the anteroventral face of the lower pharyngeal, dorsal to that of the pharyngocleithralis internus (Fig. 11C).

Pharyngocleithralis internus (phci): Like the pharyngocleithralis externus, the pharyngocleithralis internus connects the branchial arch with the pectoral girdle. Its origin is usually tendinous from the anterior face of the cleithrum, being dorsal to that of

the pharyngocleithralis externus. In most scorpaenoids (group 20-0), the origin is simple (Figs. 11, 13, 14); in the setarchid *Ectreposebastes* (group 20-1), the origin is bifid, having dorsal and ventral elements. The insertion is on the anteroventral face of the lower pharyngeal, medial to that of the pharyngocleithralis externus, and is sandwiched by the transversi ventrales anterior and posterior.

Protractor pectoralis (prp): The fan-shaped protractor pectoralis, lying ventromedially to the levator pectoralis, connects the neurocranium with the pectoral girdle. Its origin is just posterior to that of the levator posterior, if the latter is present. The anterior fibers of the protractor pectoralis grade into the membranous tissue of the posterior wall of the branchial chamber medial to the cleithrum. The posterior fibers are attached to the anterior face of the dorsal part of the cleithrum.

Levator pectoralis (lpect): The levator pectoralis, lying dorsally to the protractor pectoralis, like the latter connects the neurocranium with the pectoral girdle. The insertion of the levator pectoralis is on the anterior face of the anterodorsal process of the cleithrum.

Table 4. Comparison of characters of muscles between the pectoral girdle, neurocranium, hyoid arch, and branchial arches in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Pharyngocleithralis externus origin	Pharyngocleithralis internus origin
Sebastidae Setarchidae *Setarches* *Lioscorpius* Neosebastidae Scorpaenidae Apistidae Tetraogidae Gnathanacanthidae	lateral to origin of sternohyoideus (19-0)	simple (20-0)
Setarchidae *Ectreposebastes*		bifid (20-1)
Synanceiidae Congiopodidae *Congiopodus* Aploactinidae Pataecidae	sandwiched by origin of sternohyoideus (19-1)	simple (20-0)
Congiopodidae *Alertichthys* *Zanclorhynchus*	dorsal to origin of sternohyoideus (19-2)	

5. MUSCLES SERVING THE PECTORAL FIN (Figs. 13, 14; Table 5)

The following eight muscles serve the pectoral fin: the abductor superficialis, abductor profundus, arrector ventralis, adductor superficialis, adductor profundus, arrector dorsalis, arrector radialis, and coracoradialis.

Abductor superficialis (abs): The abductor superficialis forms the superficial division of

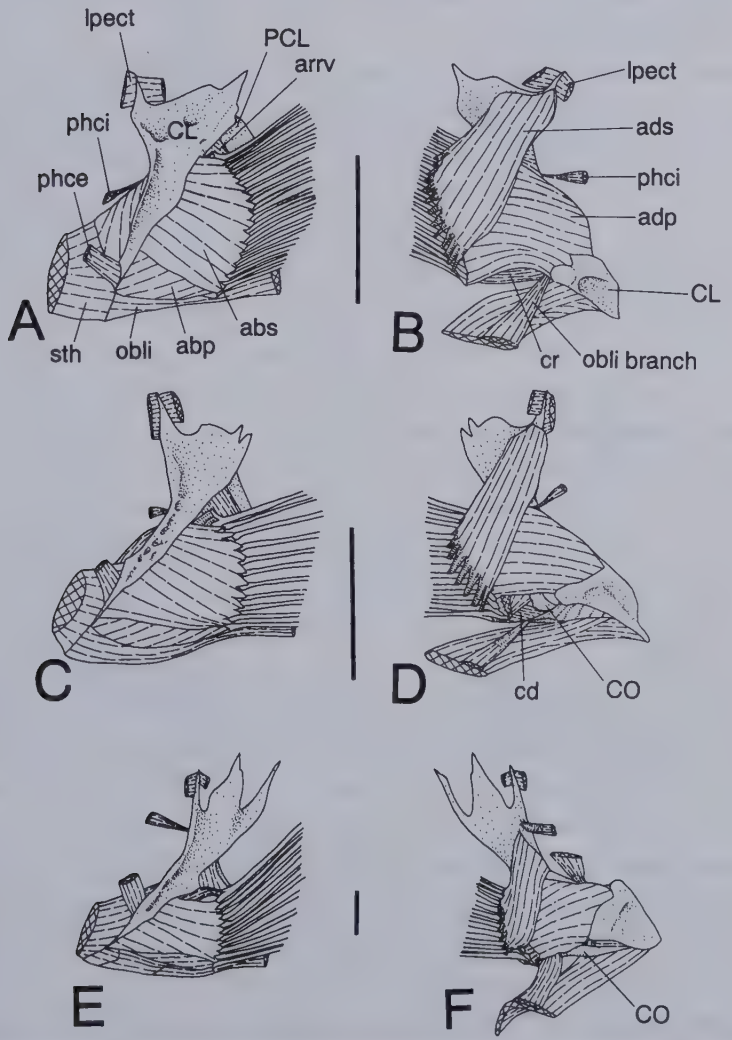


Fig. 13. Muscles of left pectoral girdle: A and B, *Scorpaenodes kelloggi*; C and D, *Hypodytes rubripinnis*; E and F, *Gnathanacanthus goetzeei*. A, C, and E, lateral view; B, D, and F, medial view.

the lateral muscle mass of the pectoral fin. The origin is from the posterolateral face of the cleithrum, and the tendinous insertions, on the dorsolateral base of the fin rays, except the uppermost.

Abductor profundus (abp): The abductor profundus forms the medial division of the lateral muscle mass of the pectoral fin. The origin is from the posterior face of the lateral flange of the cleithrum, and the lateral faces of the scapula, coracoid and, sometimes, radials. The muscle insertions are tendinous, being on the anterior bases of the fin rays, except the uppermost.

Arrector ventralis (arrv): The arrector ventralis, forming the anterodorsomedial division of the lateral muscle mass of the pectoral fin, lies medially to the abductor superficialis and anterodorsally to the abductor profundus. The origin of the arrector ventralis is from the posteroventral face of the posterior flange of the cleithrum, and its tendinous insertion on the anteromedial base of the medial half of the uppermost fin ray.

Adductor superficialis (ads): The adductor superficialis forms the dorsal and superficial divisions of the medial muscle mass of the pectoral fin. Its origin is from the dorsomedial face of the cleithrum and dorsolateral tip of the upper postcleithrum, and its tendinous insertions, on the anterodorsomedial face of the fin rays, some distance from their bases.

Adductor profundus (adp): The adductor profundus forms the medial division of the medial muscle mass of the pectoral fin, superficial to the adductor radialis, if the latter is present. The origin of the adductor profundus is from the ventromedial faces of the cleithrum and scapula, and the medial face of the coracoid. Its tendinous insertions are on the posteroventral flanges at the base of the fin rays except the uppermost.

Arrector dorsalis (arrd): Lying medially to the adductor superficialis and anterodorsally to the adductor profundus, the arrector dorsalis forms the anterodorsomedial division of the medial muscle mass of the pectoral fin. It originates from the anteromedial and often anterior face of the cleithrum, sometimes anteromedial face of the coracoid and scapula, and has tendinous insertion on the base of the medial half of the uppermost fin ray.

Adductor radialis (adr): The adductor radialis lies on the medial side of the pectoral girdle, medially to the adductor profundus. It originates from the medial faces of the lower three radials, and is inserted on the posteroventral flanges on the bases of the lower several fin rays, just medial to the insertions of the adductor profundus.

Coracoradialis (cr): The coracoradialis lies between the posteroventral margin of the coracoid and the proximal margin of the lowermost radial. Most scorpaenoids (group 21-0) have the coracoradialis (Figs. 13B, D, 14B, D); in the apistid and gnathanacanthid (group 21-1), a space is absent between the coracoid and lowermost radial, the coracoradialis

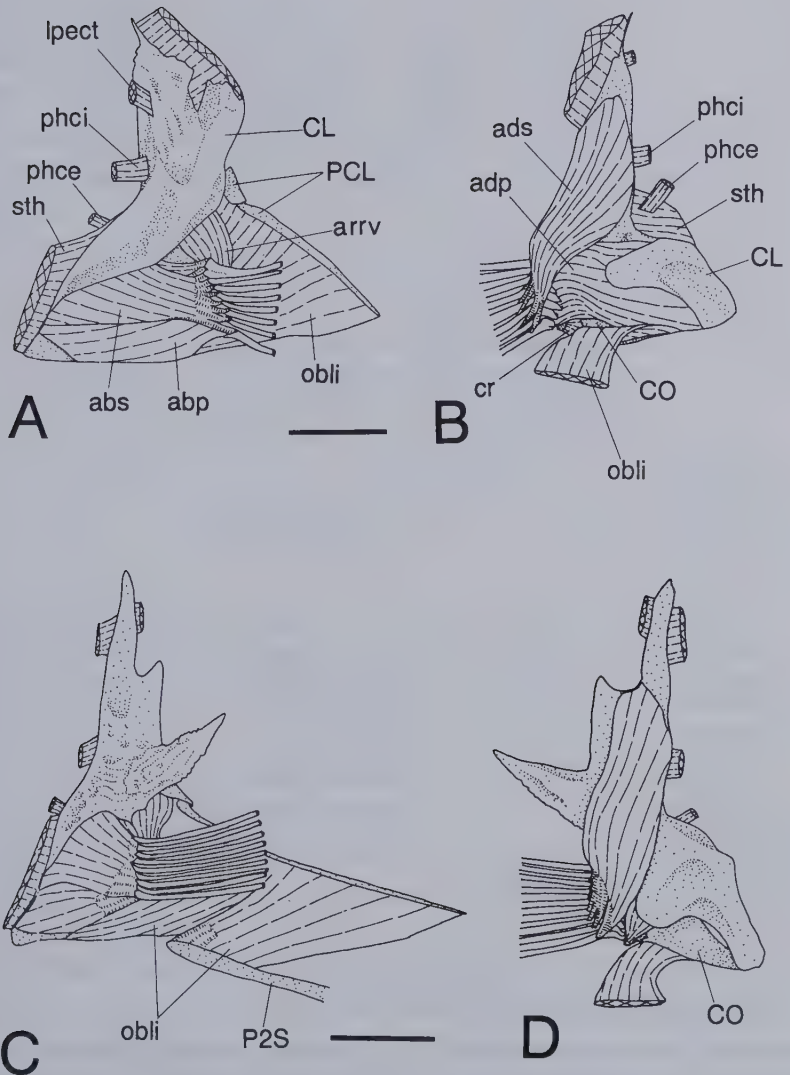


Fig. 14. Muscles of left pectoral girdle muscles: A and B, *Congiopodus coriaceus*; C and D, *Alertichthys blacki*. A and C, lateral view; B and D, medial view.

accordingly not developing (Fig. 13F). In sebastids, setarchids, neosebastids, and scorpaenids (group 22-0), the coracoradialis originates from the posteromedial face of the posterior process of the coracoid and is inserted on the ventromedial face of the lowermost radial (Fig. 13B). In tetrarogids, synanceiids, aploactinids, and pataecids (group

22-1), the origin includes the posteromedial face of the posterior process of the coracoid as in group 22-0, but the posterolateral face of the posteroventral process of the cleithrum is connected with the posteroventral process of the coracoid by a membrane, on which rather sparse fibers run from the cleithrum to the coracoradialis (Fig. 13D). The insertion is as in group 22 0. (Although group 21-1 lacks the coracoradialis, the above membrane is present (Fig. 13F)). In the congiopodids *Alertichthys* and *Zanclorhynchus* (group 22 2), the coracoradialis is short and remarkably developed between the lowermost radial and the posterolateral face of the cleithrum posteroventral process, and the posteroventral process of the coracoid (Fig. 14B). In the congiopodid *Congiopodus* (group 22-3), only a short coracoradialis is present (Fig. 14D).

Table 5. Comparison of pectoral fin muscle characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Coracoradialis	Coracoradialis origin
Sebastidae Setarchidae Neosebastidae Scorpaenidae Congiopodidae *Congiopodus*	present (21-0)	posteromedial face of posterior process of coracoid (22-0)
Tetrarogidae Synanceiidae Aploactinidae Pataecidae		including cleithrum, sparse fibers present on membrane between cleithrum and coracoid (22-1)
Congiopodidae *Alertichthys* *Zanclorhynchus*		including cleithrum, developed fibers present between cleithrum and coracoid (22-2)
Apistidae Gnathanacanthidae	absent (21-1)	

6. MUSCLES SERVING THE PELVIC FIN (Fig. 15; Table 6)

The following seven muscles serve the pelvic fin: the abductor superficialis pelvicus, abductor profundus pelvicus, arrector ventralis pelvicus, adductor superficialis pelvicus, adductor profundus pelvicus, arrector dorsalis pelvicus, and extensor proprius. Pataecids do not have pelvic fin muscle elements.

Abductor superficialis pelvicus (absp): The abductor superficialis pelvicus lies ventrally to the abductor profundus pelvicus and arrector ventralis pelvicus, having originated from the ventromedial face of the pelvis. It is inserted tendinously on the bases of the pelvic fin spine and rays. Most scorpaenoids (group 23-0) have the abductor superficialis pelvicus (Fig. 15A, C, E, G);

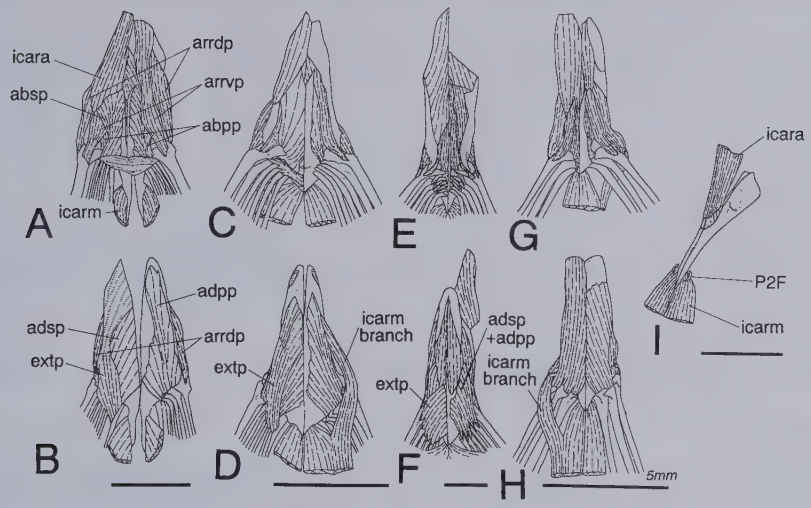


Fig. 15. Pelvic girdle muscles: A and B, *Setarches longimanus*; C and D, *Ocosia fasciata*; E and F, *Zanclorhynchus spinifer*; G and H, *Sthenopus mollis*; I, *Aetapcus vincenti*. A, C, E, and G, ventral view; B, D, F, and H, dorsal view; I, left posterolateral view.

pataecids (group 23-1) do not (Fig. 15I).

Abductor profundus pelvicus (abpp): The abductor profundus pelvicus lies medially to the abductor superficialis pelvicus, having originated from the ventral face of the pelvis. It is inserted tendinously on the bases of the pelvic fin rays. Most scorpaenoids (group 24-0) have the abductor profundus pelvicus (Fig. 15A, C, E, G); pataecids (group 24-1) do not (Fig. 15I).

Arrector ventralis pelvicus (arrvp): This muscle originates from the ventrolateral face of the pelvis and is inserted tendinously on the ventrolateral face of the base of the pelvic fin spine. Most scorpaenoids (group 25 0) have the arrector ventralis pelvicus (Fig. 15A, C, E, G); pataecids (group 25-1) do not (Fig. 15I).

Adductor superficialis pelvicus (adsp): This muscle originates from the dorsomedial face of the pelvis and is inserted on the bases of the pelvic fin spine and rays. Most scorpaenoids (group 26-0) have the adductor superficialis pelvicus (Fig. 15B, D, F, H); pataecids (group 26-1) do not (Fig. 15I). In most members of group 26-0 (group 27-0), the adductor superficialis pelvicus is separate from the adductor profundus pelvicus (Fig. 15B, D, H); in the congiopodids *Alertichthys* and *Zanclorhynchus* (group 27-1), the fibers of these muscle are united (Fig. 15F).

Adductor profundus pelvicus (adpp): The adductor profundus pelvicus, which lies ventrally to the adductor superficialis pelvicus, originates from the dorsal face of the pelvis and is inserted on the bases of the pelvic fin rays. Most scorpaenoids (group 28-0) have the adductor profundus pelvicus (Fig. 15B, D, F, H); pataecids (group 28-1) do not (Fig. 15I).

Arrector dorsalis pelvicus (arrdp): This muscle originates from the dorsolateral face of the pelvis and is inserted tendinously on the dorsolateral face of the base of the pelvic fin spine. Most scorpaenoids (group 29-0) have the arrector dorsalis pelvicus (Fig. 15B, D, F, H); pataecids (group 29-1) do not.

Extensor proprius (extp): The extensor proprius is the dorsalmost of the muscles serving the dorsal part of the pelvic fin. The muscle originates membranously from the pelvis, dorsally to the origin of the adductor superficialis pelvicus and is inserted on the base of the inner four rays of the pelvic fin and the pelvic fin spine. Most scorpaenoids (group 30-0) have the extensor proprius (Fig. 15B, D, F); aploactinids and pataecids (group 30-1) do not (Fig. 15H, 1).

Table 6. Comparison of pelvic fin muscle characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Abductor superficialis pelvicus	Abductor profundus pelvicus	Arrector ventralis pelvicus	Adductor superficiails pelvicus	Adductor superficialis pelvicus and adductor profundus pelvicus	Adductor profundus pelvicus	Arrector dorsalis pelvicus	Extensor proprius
Sebastidae Setarchidae Neosebastidae Scorpaenidae Apistidae Tetrarodidae Synanceiidae Congiopodidae *Congiopodus* Gnathanacanthidae	present (23-0)	present (24-0)	present (25-0)	present (26-0)	separate (27-0)	present (28-0)	present (29-0)	present (30-0)
Congiopodidae *Alertichthys* *Zanclorhynchus*					united (27 1)			
Aploactinidae					separate (27-0)			absent (30-1)
Pataecidae	absent (23-1)	absent (24-1)	absent (25-1)	absent (26-1)	(both absent)	absent (28-1)	absent (29-1)	

7. MUSCLES OF THE DORSAL AND ANAL FINS (Figs. 16-18; Table 7)

The muscles of the dorsal fin are composed of three elements: the erector dorsalis, depressor dorsalis, and inclinator dorsalis. These paired muscles, which lie along the dorsal midline, support the dorsal fin rays.

Erector dorsalis (erecd): In tetrarogids, congiopodids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids, the dorsal fin is connected to the posterodorsal face of the neurocranium, the origin of the anterior erectores dorsales being from a more posterior

position than that of the supported fin spines.

Depressor dorsalis (deprd): The origin is from the posterolateral face of the pterygiophore and the insertion, on the posterolateral base of the ray.

Inclinator dorsalis (incld): In sebastids, setarchids, the neosebastid *Neosebastes*,

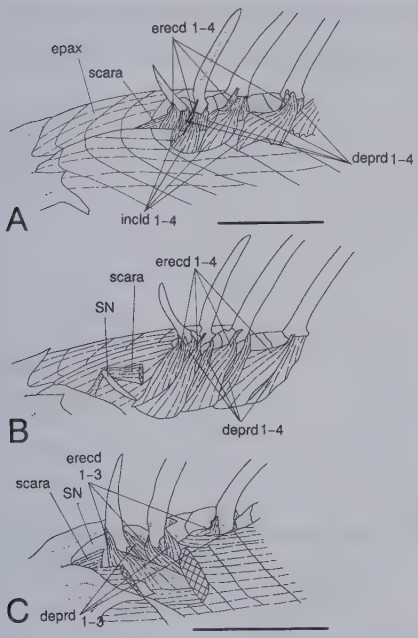


Fig. 16. Left dorsolateral view of anterior dorsal fin muscles: A and B, *Setarches longimanus*; C, *Gymnapistes marmoratus*. A, superficial muscles; B and C, deeper muscles.

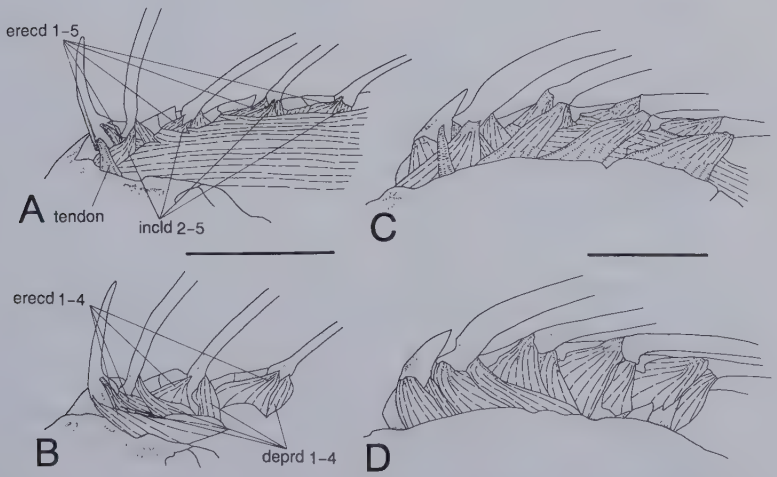


Fig. 17. Left lateral view of anterior dorsal fin muscles: A and B, *Hypodytes rubripinnis*; C and D, *Aetapcus vincenti*. A and C, superficial muscles; B and D, deeper muscles.

scorpaenids, the synanceiid *Minous*, the congiopodids *Congiopodus* and *Alertichthys*, and the gnathanacanthid (group 31-0), inclinator dorsalis 1 supporting dorsal spine 1 is present (Fig. 16A); in the neosebastid *Maxillicosta*, the apistid, tetrarogids, synanceiids except *Minous*, the congiopodid *Zanclorhynchus*, aploactinids, and pataecids (group 31-1), inclinator dorsalis 1 fibers are absent, with only a tendon remaining (Figs. 17A, C, 18A).

The muscles of the anal fin are composed of three elements: the erector analis, depressor

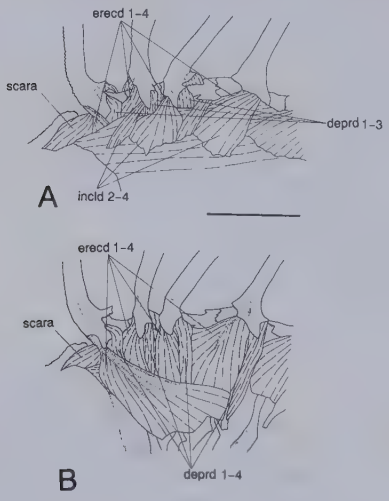


Fig. 18. Left lateral view of *Zanclorhynchus spinifer*. A, superficial muscles; B, deeper muscles.

Table 7. Comparison of dorsal fin muscle characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Inclinator dorsalis 1 fibers
Sebastidae Setarchidae Neosebastidae *Neosebastes* Scorpaenidae Synanceiidae *Minous* Congiopodidae Gnathanacanthidae	normally developed (31-0)
Neosebastidae *Maxillicosta* Apistidae Tetraogidae Synanceiidae except *Minous* Aploactinidae Pataecidae	reduced (31 1)

analis, and inclinator analis. These paired muscles, which lie along the ventral midline, support the anal fin rays in much the same manner as the dorsal fin.

8. CARINAL MUSCLES (Figs. 15–18; Table 8)

The carinal muscles comprise five paired elements: the supracarinalis anterior, supracarinalis posterior, infracarinalis anterior, infracarinalis medius, and infracarinalis

Table 8. Comparison of carinal muscle characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Supracarinalis anterior	Anterior limit of infracarinalis medius
Sebastidae Setarchidae Neosebastidae *Neosebastes* Scorpaenidae except *Ebosia*, *Brachypterois*, *Dendrochirus*, and *Parapterois* Apistidae Congiopodidae Gnathanacanthidae	present (32–0)	simple, on posterior process of pelvic girdle (33–0)
Neosebastidae *Maxillicosta* Scorpaenidae *Ebosia* *Brachypterois* *Dendrochirus* *Parapterois* Tetrarogidae *Gymnapistes* *Centropogon* *Notesthes* *Neocentropogon* *Ocosia* Synanceiidae		branched, medial branch on posterior process of pelvic girdle, lateral branch on ventral face of base of pelvic girdle (33–1)
Tetrarogidae *Paracentropogon* *Hypodytes* *Liocranium* *Ablabys* *Richardsonichthys* Aploactinidae	absent (32–1)	
Pataecidae		simple, on posterior process of pelvic girdle (33–0)

posterior. The right and left elements of each muscle lie along the dorsal and ventral midlines, the fibers running parallel to each other.

Supracarinalis anterior (scara): This muscle connects the supraoccipital with the first proximal pterygiophore of the dorsal fin and sandwiches the supraneural, if present. Sebastids, setarchids, neosebastids, scorpaenids, the apistid, the tetrarogids *Gymnapistes, Centropogon, Notesthes, Neocentropogon*, and *Ocosia*, synanceiids, congiopodids, and the gnathanacanthid (group 32–0) have the supracarinalis anterior, (Figs. 16, 18); the tetrarogids *Paracentropogon, Hypodytes, Liocranium*, and *Ablabys*, aploactinids, and pataecids (group 32–1) do not have this muscle, owing to the direct articulation of the supraoccipital with the anterior proximal pterygiophores of the dorsal fin (Fig. 17).

Supracarinalis posterior (scarp): This muscle connects the dorsal stay with the distal tip of the last neural spine.

Infracarinalis anterior (icara): This muscle connects the posteroventral tip of the cleithrum with the anteroventral face of the pelvic girdle.

Infracarinalis medius (icarm): This muscle connects the pelvic girdle with the first proximal pterygiophore of the anal fin. In sebastids, setarchids, the neosebastid *Neosebastes*, scorpaenids except *Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus*, and *Parapterois*, the apistid, congiopodids, the gnathanacanthid, and pataecids (group 33–0), the anterior limit of the muscle extends to the posterior process of the pelvic girdle (Fig. 15B, F); in the neosebastid *Maxillicosta*, the scorpaenids *Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus*, and *Parapterois*, tetrarogids, synanceiids, and aploactinids (group 33–1), the anterior part of the muscle is divided, the medial branch extending to the pelvic girdle in group 33–0 and the lateral branch being attached to the ventral face of the base of the pelvic girdle or pelvic spine (Fig. 15D, H).

Infracarinalis posterior (icarp): This muscle connects the anal stay with the distal tip of the last hemal spine.

9. MUSCLES SERVING THE CAUDAL FIN (Figs. 19, 20; Table 9)

The following eight muscles serve the caudal fin: the interradialis, hypochordal longitudinalis, flexor dorsalis, flexor dorsalis superior, flexor ventralis, flexor ventralis inferior, flexor ventralis externus, and adductor dorsalis.

Interradialis (int): The interradialis is the posteriormost muscle, being composed of several muscle bundles interconnecting the principal caudal rays. The muscle bundle between the base of the uppermost ray of the lower lobe and the rays of the upper lobe lies superficially to the muscle bundle between the base of the lowermost ray of the upper lobe and the rays of the lower lobe.

Hypochordal longitudinalis (hl): The triangular hypochordal longitudinalis, which overlaps the posterior limit of the epaxialis, originates from the dorsolateral face of the lower hypural or its complex and is inserted tendinously on the dorsal bases of the upper three to five principal rays of the upper lobe.

Flexor dorsalis (fd): The flexor dorsalis, which is covered by the posterior part of the epaxialis, originates from the dorsolateral face of the centra of a few preural vertebrae, the urostyle, and upper hypurals or their complex, and is inserted on the bases of the principal rays of the upper lobe.

Flexor dorsalis superior (fds): The flexor dorsalis superior, which lies dorsally to the flexor dorsalis, originates from the neural spines of a few preural vertebrae and epurals, and is inserted on the bases of a few upper procurrent and principal rays of the upper lobe.

Flexor ventralis (fv): The flexor ventralis, which is covered by the posterior part of the hypaxialis, originates from the ventrolateral face of the centra of a few preural vertebrae, the urostyle, parhypural, and lower hypurals or their complex, and is inserted on the bases of the principal rays of the lower lobe.

Flexor ventralis inferior (fvi): The flexor ventralis inferior, which lies ventrally to the flexor ventralis, originates from the hemal spines of a few preural vertebrae and is inserted on the bases of a few lower procurrent and principal rays of the lower lobe.

Flexor ventralis externus (fve): In most scorpaenoids (group 34-0), the flexor ventralis

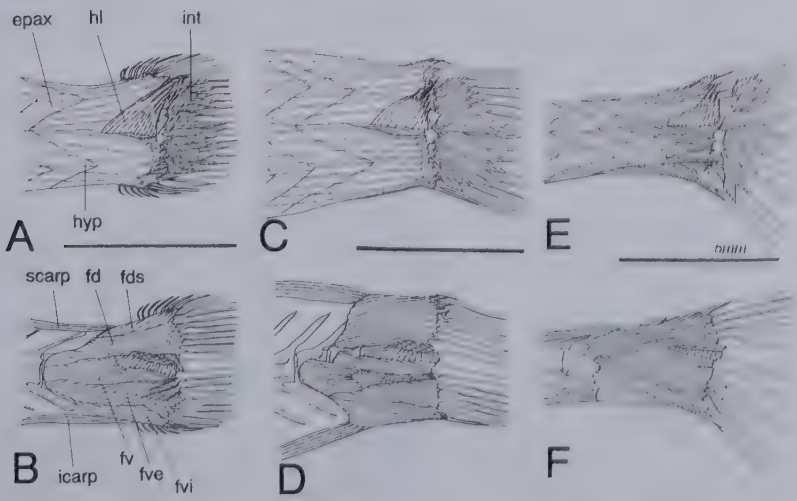


Fig. 19. Caudal muscles: A and B, *Lioscorpius longiceps*; C and D, *Choridactylus multibarbus*; E and F, *Pataecus fronts*. A, C, and E, superficial muscles; B, D, and F, deeper muscles.

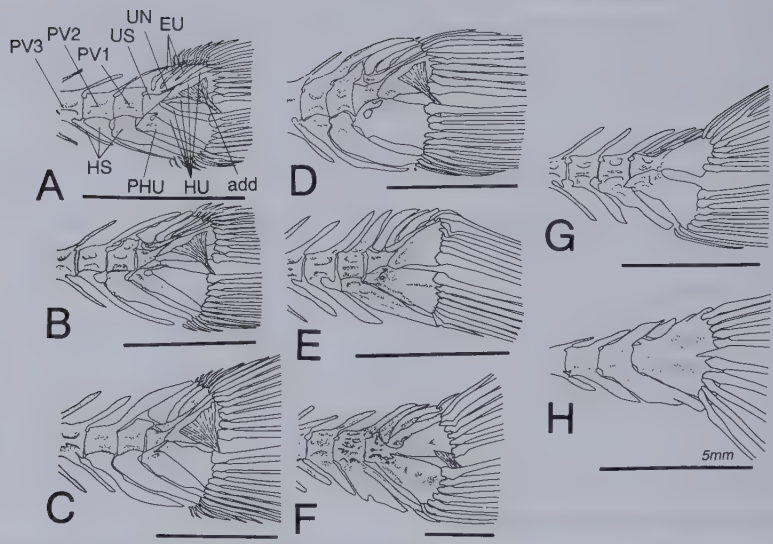


Fig. 20. Caudal skeletons and adductor dorsalis: A, *Lioscorpius longiceps*; B, *Hoplosebastes armatus*; C, *Iracundus signifer*; D, *Centropogon australis*; E, *Choridactylus multibarbus*; F, *Gnathanacanthus goetzeei*; G, *Erisphex potti*; H, *Pataecus fronts.*

Table 9. Comparison of caudal fin muscle characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Flexor ventralis externus	Adductor dorsalis
Sebastidae Setarchidae Neosebastidae Scorpaenidae Apistidae Tetrarogidae Gnathanacanthidae	present (34-0)	present (35-0)
Synanceiidae *Inimicus* *Choridactylus* *Minous* Aploactinidae		absent (35-1)
Synanceiidae *Synanceia* *Erosa* Congiopodidae Pataecidae	absent (34-1)	

externus is present (Fig. 19B, D), overlying the flexor ventralis. The origin of the former is usually from the ventrolateral face of the centrum and hemal spine of preural vertebra 2, sometimes including the base of the hemal spine of preural vertebra 3. The insertions are tendinous on the bases of a few upper principal rays of the lower lobe. In the synanceiids *Synanceia* and *Erosa*, congiopodids, and pataecids (group 34-1), this muscle is absent (Fig. 19F).

Adductor dorsalis (add): In sebastids, setarchids, neosebastids, scorpaenids, the apistid, tetrarogids, and the gnathanacanthid (group 35-0), the adductor dorsalis is present (Fig. 20A-D). This triangular muscle, which lies medially to the flexor dorsalis, originates from the dorsolateral face of the upper hypurals or their complex and is inserted on the dorsal base of the uppermost principal ray of the lower lobe. In synanceiids, congiopodids, aploactinids, and pataecids (group 35-1), this muscle is absent (Fig. 20E-H).

10. BODY MUSCLES (Figs. 13, 14, 16-19, 21-24; Tables 10, 11)

The body muscles comprise two elements: the epaxialis and hypaxialis. The latter is subdivided into two entities: the obliquus superioris and obliquus inferioris. The lateralis superficialis is absent in scorpaenoids.

Epaxialis (epax): The epaxialis is the dorsal component of the body muscle above the horizontal septum.

Hypaxialis (hypax): The hypaxialis is the ventral component of the body muscle below the horizontal septum.

Obliquus superioris (obls): The obliquus superioris is that part of the hypaxialis with fibers running in an anterodorsal-posteroventral direction. The anterior part of the

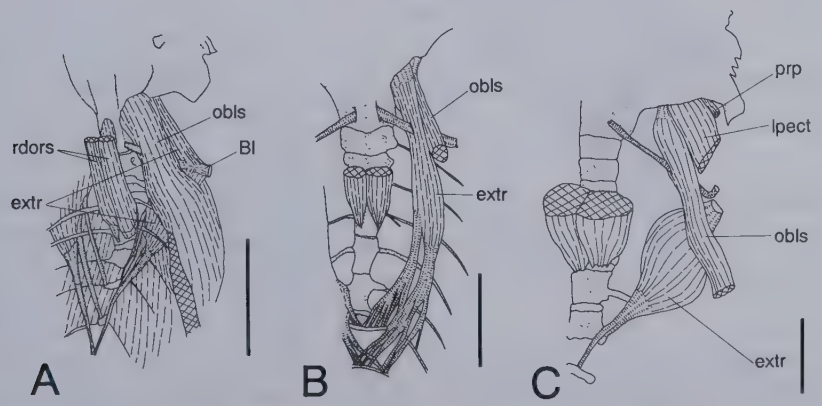


Fig. 21. Ventral view of roof of abdominal cavity: A, *Iracundus signifer*; B, *Ectreposebastes imus*; C, *Neosebastes pandus* (swimbladder removed).

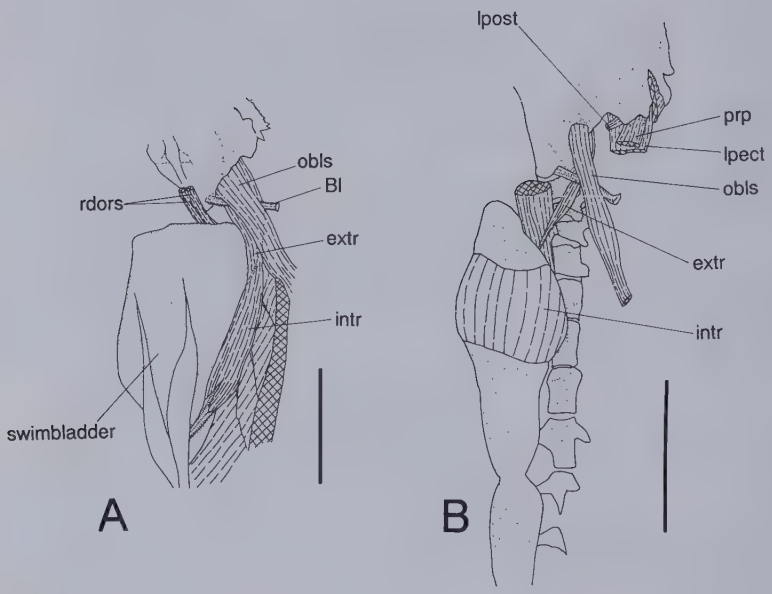


Fig. 22. Ventral view of swimbladder and associated muscles: A, *Brachypterois serrulatus*; B, *Apistus carinatus*.

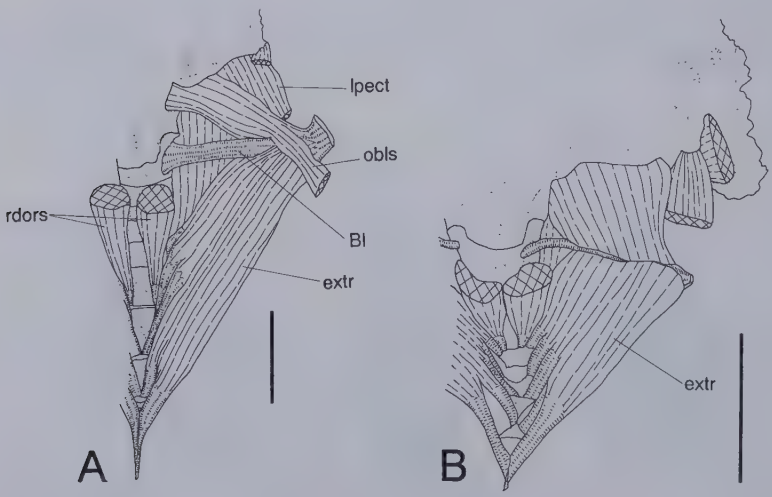


Fig. 23. Ventral view of roof of abdominal cavity: A, *Inimicus japonicus*; B, *Erosa erosa*.

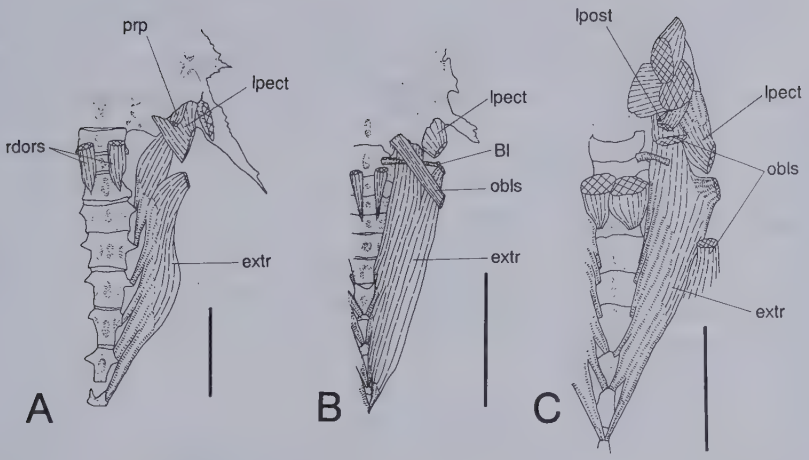


Fig. 24. Ventral view of roof of abdominal cavity: A, *Zanclorhynchus spinifer*; B, *Erisphex potti* (swimbladder removed); C, *Aetapcus vincenti* (swimbladder removed).

obliquus superioris forms the roof of the abdominal cavity. In sebastids, the setarchid *Setarches*, neosebastids, the scorpaenids *Pontinus, Neomerinthe, Phenacoscorpius, Parascorpaena, Scorpaena, Iracundus*, and *Scorpaenopsis*, and the tetrarogids *Centropogon, Notesthes*, and *Paracentropogon* (group 36-0), the obliquus superioris from the posterior face of the neurocranium is penetrated by Baudelot's ligament (Fig. 21A, C); in the setarchids *Lioscorpius* and *Ectreposebastes*, the scorpaenids *Scorpaenodes, Hoplosebastes, Pterois, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus, Parapterois, Rhinopias*, and *Taenianotus*, the apistid, the tetrarogids *Gymnapistes, Neocentropogon, Ocosia, Hypodytes, Liocranium, Ablabys*, and *Richardsonichthys*, synanceiids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 36 -1), the obliquus superioris from the posterior face of the neurocranium lies ventrally to Baudelot's ligament (Figs. 21B, 22, 23, 24B, C). In most scorpaenoids (group 37-0), the obliquus superioris from the posterior face of the neurocranium is not connected with the supracleithrum (Figs. 21, 22, 24); in synanceiids except *Erosa* (group 37-1), fibers from the lateral part of the obliquus superioris from the posterior face of the neurocranium are connected with the medial face of the supracleithrum, together with Baudelot's ligament and the lateral branch of the extrinsic (Fig. 23A); in the synanceiid *Erosa* (group 37-2), all fibers of the obliquus superioris from the posterior face of the neurocranium are connected with the supracleithrum (Fig. 23B).

Obliquus inferioris (obli): The obliquus inferioris is that part of the hypaxialis with fibers running in an anteroventral-posterodorsal direction. Variations in the relationship between the obliquus inferioris and the pectoral girdle were observed in scorpaenoids. In

Table 10. Comparison of characters of obliquus superioris and muscles associated with swimbladder in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Obliquus superioris from posterior face of neurocranium and Baudelot's ligament		Swimbladder	Extrinsic and pleural rib	Each insertion of extrinsic	Extrinsic origin	Extrinsic and supracleithrum		Intrinsic	Intrinsic and extrinsic	Baudelot's ligament
Sebastidae *Sebastes* *Sebastiscus* *Hozukius* Setarchidae *Setarches* Scorpaenidae *Pontinus* *Phenacoscorpius*	penetrated by Baudelot's ligament (36-0)		present (41-0)	lying dorsally to several anterior pleural ribs (42-0)	simple (43-0)	includes neurocranium (44-0)	connected (45-0)	connected through Baudelot's ligament (46-0)	absent (47-0)		present (49-0)
Sebastidae *Helicolenus* *Adelosebastes* *Sebastolobus* *Trachyscorpia* *Plectrogenium* Neosebastidae *Maxillicosta* Scorpaenidae *Neomerinthe* *Parascorpaena* *Scorpaena* *Iracundus*			absent (41-1)								
Tetrarogidae *Paracentropogon*			present (41-0)			excludes neurocranium (44-1)					
Neosebastidae *Neosebastes*											
Scorpaenidae *Scorpaenopsis* Tetrarogidae *Centropogon* *Notesthes*			absent (41-1)			includes neurocranium (44-0)					
Tetrarogidae *Gymnapistes* *Neocentropogon* *Hypodytes* *Ablabys* Gnathanacanthidae Pataecidae	bypassing and lying ventrally to Baudelot's ligament (36-1)	not connected with supracleithrum (37-0)	present (41-0)								
Scorpaenidae *Rhinopias* Tetrarogidae *Ocosia* *Richardsonichthys*			absent (41-1)								
Setarchidae *Ectreposebastes*					branched (43-1)						
Scorpaenidae *Taenianotus*					simple (43-0)	excludes neurocranium (44-1)					
Setarchidae *Lioscorpius*				lying ventrally to several anterior pleural ribs (42-1)		includes neurocranium (44-0)	not connected (45-1)		present (47-1)	connected (48-0)	
Scorpaenidae *Scorpaenodes* *Hoplosebastes* *Pterois* Tetrarogidae *Liocranium*			present (41-0)								
Scorpaenidae *Ebosia* *Brachypterois* *Dendrochirus* *Parapterois*			absent (41-1)								
Apistidae			present (41-0)							separate (48-1)	
Aploactinidae *Erisphex*					simple (43-0)		connected (45-0)	directly connected (46-1)	absent (47-0)		
Aploactinidae *Aploactis* *Sthenopus*			absent (41-1)								
Synanceiidae *Synanceia* *Choridactylus* *Minous*		fibers of lateral part connected with supracleithrum (37-1)	present (41-0)					connected through Baudelot's ligament (46-0)			
Synanceiidae *Inimicus*			absent (41-1)								
Synanceiidae *Erosa*		entirely connected with supracleithrum (37-2)									
Congiopodidae *Congiopodus* *Alertichthys*	(Baudelot's ligament absent)	not connected with supracleithrum (37-0)	present (41-0)					directly connceted (46-1)			absent (49-1)
Congiopodidae *Zanclorhynclus*			absent (41-1)								

most scorpaenoids (group 38-0), a plate-shaped fiber bundle lying laterally to the main muscle fibers originates from the anterior margin of the ventral postcleithrum and is inserted on the posterolateral process of the coracoid just ventral to the coracoradialis (Fig. 13B, D, F). In pataecids, which lack postcleithra, such a plate-shaped fiber bundle of the obliquus inferioris is present, but in congiopodids (group 38-1), it is absent (Fig. 14B, D). Among group 38-0, insertion of the bundle is by broad muscle fibers in sebastids, setarchids, the neosebastid *Neosebastes*, scorpaenids except *Rhinopias* and *Taenianotus*, and the gnathanacanthid (group 39-0) (Fig. 13B, F); it is tendinous in the neosebastid *Maxillicosta*, the scorpaenids *Rhinopias* and *Taenianotus*, the apistid, tetrarogids, synanceiids, aploactinids, and pataecids (group 39-1) (Fig. 13D). In most scorpaenoids (group 40-0), the anteroventral limit of the main part of the obliquus inferioris is on the posteroventral face of the cleithrum, ventral to the abductor profundus (Fig. 13B, D, F); in the congiopodid *Congiopodus* (group 40-1), the anteroventral limit of the muscle is on the

Table 11. Comparison of obliquus inferioris muscle characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

<table>
<tr><th>Taxion</th><th colspan="2">Plate-shaped element of obliquus inferious between ventral postcleithrum and coracoid</th><th>Anteroventral limit of obliquus inferioris</th></tr>
<tr><td>Sebastidae
Setrachidae
Neosebastidae
Neosebastes
Scorpaenidae
except
Rhinopias and
Taenianotus
Gnathanacanthidae</td><td rowspan="2">present
(38-0)</td><td>insertion by rather broad muscle fibers
(39-0)</td><td rowspan="2">posteroventral face of cleithrum ventral to abductor profundus
(40-0)</td></tr>
<tr><td>Neosebastidae
Maxillicosta
Scorpaenidae
Rhinopias
Taenianotus
Apisitidae
Tetrarogidae
Synanceiidae
Aploactinidae
Pataecidae</td><td>insertion tendinous
(39-1)</td></tr>
<tr><td>Congiopodidae
Congiopodus</td><td rowspan="2" colspan="2">absent
(38-1)</td><td>ventrolateral face of anteroventral arm of coracoid
(40-1)</td></tr>
<tr><td>Congiopodidae
Alertichthys
Zanclorhynchus</td><td>branched, one branch connected to coracoid and adductor profundus, the other to pelvis
(40-2)</td></tr>
</table>

ventrolateral face of the anteroventral arm of the coracoid (Fig. 14B); in the congiopodids *Alertichthys* and *Zanclorhynchus* (group 40 2), the anteroventral part of the muscle is divided, one branch being connected with the ventrolateral margin of the anteroventral arm of the coracoid and the ventral face of the adductor profundus, and the other with the pelvis (Fig. 14C).

11. SWIMBLADDER AND ASSOCIATED MUSCLES (Figs. 21-23; Table 10)

Swimbladder: Although not a muscular organ itself, the swimbladder is closely associated with the extrinsic and intrinsic, which show structural variations among scorpaenoids. Accordingly, the presence or absence of the swimbladder is noted here. In the sebastids *Sebastes, Sebastiscus*, and *Hozukius*, the setarchid *Setarches*, the neosebastid *Neosebastes*, the scorpaenids *Pontinus, Phenacoscorpius, Scorpaenodes, Hoplosebastes*, and *Pterois*, the apistid, the tetrarogids *Gymnapistes, Neocentropogon, Paracentropogon, Hypodytes, Liocranium*, and *Ablabys*, the synanceiids *Synanceia, Choridactylus*, and *Minous*, the congiopodids *Congiopodus* and *Alertichthys*, the gnathanacanthid, the aploactinid *Erisphex*, and pataecids (group 41 - 0), the swimbladder is present; in the sebastids *Helicolenus, Adelosebastes, Sebastolobus, Trachyscorpia*, and *Plectrogenium*, the setarchids *Lioscorpius* and *Ectreposebastes*, the neosebastid *Maxillicosta*, the scorpaenids *Neomerinthe, Parascorpaena, Scorpaena, Iracundus, Scorpaenopsis, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus, Parapterois, Rhinopias*, and *Taenianotus*, the tetrarogids *Centropogon, Notesthes, Ocosia*, and *Richardsonichthys*, the synanceiids *Inimicus* and *Erosa*, the congiopodid *Zanclorhynchus*, and the aploactinids *Aploactis* and *Sthenopus* (group 41 - 1), the swimbladder is absent.

Extrinsic (extr): In sebastids, the setarchid Setarches, the neosebastid *Maxillicosta*, and the scorpaenids *Pontinus, Neomerinthe, Phenacoscorpius, Parascorpaena, Scorpaena*, and *Iracundus* (group 42 0), the muscle fibers of the extrinsic lie dorsally to several anterior pleural ribs (Fig. 21A); in the setarchids *Lioscorpius* and *Ectreposebastes*, the neosebastid *Neosebastes*, the scorpaenids *Scorpaenopsis, Scorpaenodes, Hoplosebastes, Pterois, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus, Parapterois, Rhinopias*, and *Taenianotus*, the apistid, tetrarogids, synanceiids, congiopodids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 42-1), the muscle fibers of the extrinsic lie ventrally to the pleural ribs (Figs. 21B, C, 22 - 24). In most scorpaenoids (group 43 - 0), the insertion of the muscle on the swimbladder or on the vertebral parapophyses is simple (Figs. 21A, C, 22 - 24); in the setarchid *Ectreposebastes* (group 43 1), the insertion on the vertebral parapophyses is branched (Fig. 21B). This variation parallels the origin of the pharyngocleithralis internus

(groups 20-0 and 20-1). In most scorpaenoids (group 44-0), the origin of the extrinsic is from the occipital face of the neurocranium and, often, the supracleithrum (Figs. 21A, B, 22-24); in the neosebastid *Neosebastes* and the scorpaenid *Taenianotus* (group 44-1), the origin is only from the medial face of the supracleithrum (Fig. 21C). In sebastids, the setarchids *Setarches* and *Ectreposebastes*, neosebastids, the scorpaenids *Pontinus, Neomerinthe, Phenacoscorpius, Parascorpaena, Scorpaena, Scorpaenopsis, Iracundus, Rhinopias*, and *Taenianotus*, tetrarogids except *Liocranium*, synanceiids, congiopodids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 45-0), the extrinsic is connected with the supracleithrum (Figs. 21, 23, 24); in the setarchid *Lioscorpius*, the scorpaenids *Scorpaenodes, Hoplosebastes, Pterois, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus*, and *Parapterois*, the apistid, and the tetrarogid *Liocranium* (group 45-1), the simple extrinsic is not connected with the supracleithrum (Fig. 22). Among group 45-0, the extrinsic is connected with the supracleithrum through Baudelot's ligament in sebastids, the setarchids *Setarches* and *Ectreposebastes*, the scorpaenids *Pontinus, Neomerinthe, Phenacoscorpius, Parascorpaena, Scorpaena, Scorpaenopsis, Iracundus, Rhinopias*, and *Taenianotus*, tetrarogids except *Liocranium*, synanceiids, the gnathanacanthid, and pataecids (group 46-0) (Figs. 21A, B, 23, 24C); the extrinsic is directly connected with the supracleithrum in neosebastids, congiopodids, and aploactinids (group 46-1) (Figs. 21C, 24A, B).

Intrinsic (intr): The origin and insertion of the intrinsic are on the swimbladder. In sebastids, setarchids, neosebastids, the scorpaenids *Pontinus, Neomerinthe, Phenacoscorpius, Parascorpaena, Scorpaena, Scorpaenopsis, Iracundus, Rhinopias*, and *Taenianotus*, tetrarogids except *Liocranium*, synanceiids, congiopodids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 47-0), the intrinsic is absent (Figs. 21, 23, 24); in the scorpaenids *Scorpaenodes, Hoplosebastes, Pterois, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus*, and *Parapterois*, the apistid, and the tetrarogid *Liocranium* (group 47-1), the intrinsic is present (Fig. 22); in most of group 47-1 (group 48-0), the intrinsic is connected with the extrinsic (Fig. 22A); in the apistid (group 48-1), the intrinsic and extrinsic are not connected (Fig. 22B).

Baudelot's ligament: Baudelot's ligament connects the posterolateral face of the basioccipital or lateral face of the first or second vertebral centrum with the medial face of the supracleithrum. Most scorpaenoids (group 49-0) have Baudelot's ligament (Figs. 21-23, 24B, C); congiopodids (group 49-1) do not (Figs. 24A).

III. OSTEOLOGY

1. NEUROCRANIUM (Figs. 25-28; Table 12)

The neurocranium of scorpaenoids is generally robust, often bearing ridges, spines, and grooves on the dorsal surface. It comprises the following 17 bony elements: the ethmoid, lateral ethmoid, prevomer, pterosphenoid, basisphenoid, frontal, sphenotic, pterotic, epiotic, prootic, exoccipital, supraoccipital, parietal, intercalar, supratemporal, basisphenoid, and parasphenoid.

Ethmoid (E): The ethmoid is an unpaired bone in the anterodorsal part of the neurocranium, overlying the ethmoid cartilage and articulating with the lateral ethmoid laterally and the frontal posteriorly. The relationships between the ethmoid, parasphenoid, lateral ethmoid, and prevomer are noted in the description of the lateral ethmoid.

Lateral ethmoid (LE): The lateral ethmoid, a paired bone lying on the posterolateral side of the ethmoid and pierced by an olfactory nerve, form the anterodorsal margin of the orbit. The dorsolateral margin often bears a preorbital spine. This bone articulates with the ethmoid anteromedially and the frontal posterodorsally. In sebastids, setarchids, neosebastids, the scorpaenids *Pontinus, Neomerinthe, Phenacoscorpius, Parascorpaena, Scorpaena, Iracundus, Scorpaenopsis, Scorpaenodes*, and *Hoplosebastes*, the apistid, tetrarogids, synanceiids, the gnathanacanthid, and the aploactinids *Aploactis* and *Erisphex* (group 50-0), the lateral ethmoid articulates directly with the prevomer anteroventrally, thus separating the ethmoid and parasphenoid (Fig. 25), although in the sebastids *Sebastolobus* and *Trachyscorpia*, cartilage fills the narrow space between the lateral ethmoid and prevomer; in the scorpaenids *Pterois, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus, Parapterois, Rhinopias*, and *Taenianotus*, congiopodids, the aploactinid *Sthenopus*, and pataecids (group 50-1), the lateral ethmoid is separated from the prevomer by the articulation of the ethmoid and parasphenoid, or a large mass of cartilage (Fig. 26-28).

Prevomer (PV): The prevomer, an unpaired bone lying in the anteriormost region of the neurocranium, forms the anterior end of the roof of the oral cavity, being adjacent to the premaxilla anteriorly. In sebastids, setarchids, neosebastids, scorpaenids except *Taenianotus*, the apistid, tetrarogids, the synanceiids *Inimicus, Erosa*, and *Minous*, the congiopodid *Zanclorhynchus*, aploactinids, and the pataecids *Pataecus* and *Neopataecus* (group 51-0), a villiform tooth band is present on the prevomer (Figs. 25, 27); in the scorpaenid *Taenianotus*, the synanceiids *Synanceia* and *Choridactylus*, the congiopodids *Congiopodus* and *Alertichthys*, the gnathanacanthid, and the pataecid *Aetapcus* (group 51-1), prevomerine teeth are absent (Figs. 26, 28). The prevomer articulates with the ethmoid

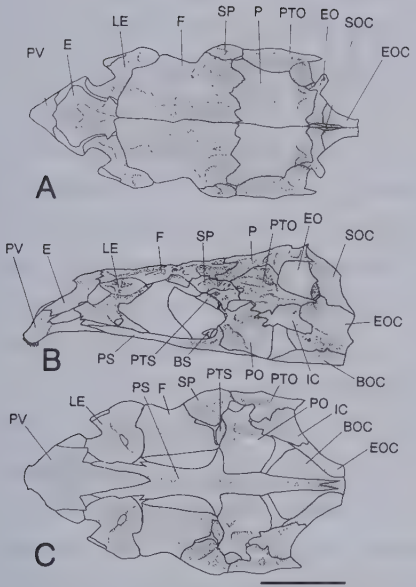


Fig. 25. Neurocranium of *Ectreposebastes imus*. A, dorsal view; B, left lateral view; C, ventral view.

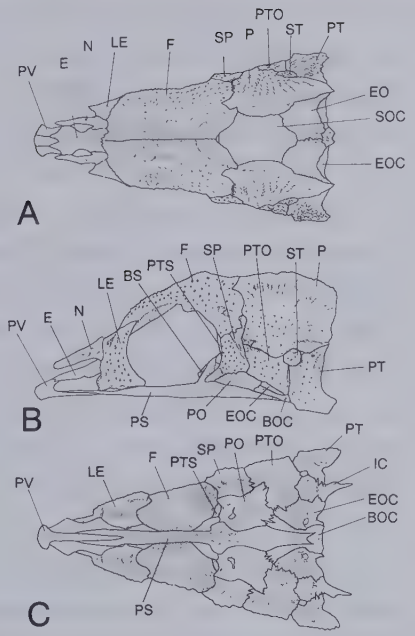


Fig. 26. Neurocranium of *Congiopodus coriaceus*. A, dorsal view; B, left lateral view; C, ventral view.

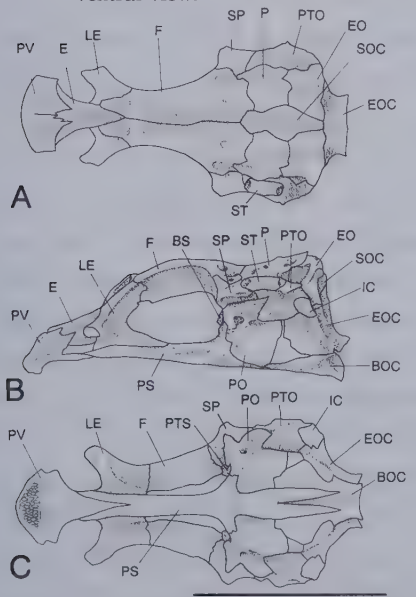


Fig. 27. Neurocranium of *Sthenopus mollis*. A, dorsal view; B, left lateral view; C, ventral view.

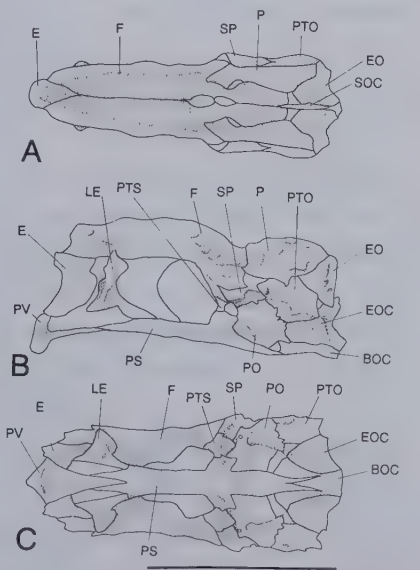


Fig. 28. Neurocranium of *Pataecus fronts*. A, dorsal view; B, left lateral view; C, ventral view.

posterodorsally and the parasphenoid posteriorly. The relationship between the prevomer and lateral ethmoid is noted in the description of the lateral ethmoid.

Pterosphenoid (PTS): The pterosphenoid, a paired, plate-shaped bone associated with the frontal, sphenotics, and prootics, forms the posteroventral face of the orbit.

Basisphenoid (BS): The basisphenoid is a very small, unpaired bone lying at the posteroventral end of the orbit. It is present in most scorpaenoids, including *Setarches* (group 52-0), this bone is present (Figs. 25-27); in the congiopodids *Alertichthys* and *Zanclorhynchus* and pataecids (group 52-1), it is absent (Fig. 28). From an examination of Japanese scorpaenoids that are here included in group 52-1, Matsubara (1943, 1955) stated that the basisphenoid was entirely absent in *Setarches*, but always present in the other scorpaenoids. The conclusion of Eschmeyer and Collette (1966) and Eschmeyer (1984) that the basisphenoid exists in *Setarches* is verified here.

Frontal (F): The frontals, paired bones over the orbit forming the middle roof the neurocranium, articulate dorsomedially, forming a concave, flat or convex interorbital region. The posterolateral edge of the frontal often bears supraorbital, postorbital, and tympanic spines. The frontal articulates with the ethmoid anteromedially, the lateral ethmoid anterolaterally, the sphenotic posterolaterally, the pterosphenoid posteroventrally, the parietal posteriorly, and the supraoccipital posteromedially. The suture between the frontal and supraoccipital is often overlapped by the parietal.

Sphenotic (SP): The sphenotics are paired bones forming the posterolateral processes of the orbit. On the upper part of this bone, a dermosphenotic (DS) is often present (group 56 0) (Fig. 1 A, C). The sphenotic articulates with the frontal dorsomedially, the pterosphenoid anteroventrally, the prootic ventrally, and the pterotic posteriorly.

Pterotic (PTO): The pterotics, paired bones forming the posterolateral face of the neurocranium, bear a spine on the posterolateral margin. Articulation is with the sphenotic anteriorly, the parietal anterodorsally, the epiotic posterodorsally, the prootic anteroventrally, the intercalar, if present, posteroventrally, and the supraoccipital posteriorly. The pterotic and sphenotic form a longitudinal groove articulating with the dorsal margin of the hyomandibular. The relationships between the pterotic, exoccipital, prootic, and intercalar are noted in the description of intercalar.

Epiotic (EO): The epiotic, a paired bone forming the posterodorsal part of the neurocranium, articulates with the supraoccipital dorsally, the parietal anterodorsally, the pterotic anteroventrally, and the exoccipital ventrally. In most scorpaenoids (group 53 0), the epiotics do not meet in the midline, owing to the intervening articulation of the supraoccipital and exoccipital (Figs. 25, 27, 28); in congiopodids (group 53-1), the epiotics meet in the midline, thus separating the supraoccipital and exoccipital (Fig. 26).

Prootic (PO): The prootic, a paired bone forming the otic capsule base, articulates with the pterosphenoid anteriorly, the sphenotic anterodorsally, the pterotic dorsally, the exoccipital posteriorly, the basioccipital posteroventrally, and the parasphenoid ventrally. The relationships between the prootic, pterotic, exoccipital, and intercalar are noted in the description of the intercalar.

Exoccipital (EOC): The exoccipital, a paired bone surrounding the foramen magnum, articulates with the epiotic anterodorsally, pterotic, intercalar, and prootic anteriorly, and the basioccipital ventrally. The exoccipitals and basioccipital together form a condyle for articulation with the first vertebra. The relationship between the exoccipital, supraoccipital, and epiotic are noted in the description of the epiotic, and those between the exoccipital, prootic, pterotic, and intercalar, in the description of the intercalar.

Supraoccipital (SOC): The supraoccipital, an unpaired bone forming the posterior roof of the neurocranium, articulates laterally with the parietals, posterolaterally with the epiotics, and often, anteriorly with the frontals. The relationships between the supraoccipital, exoccipital, and epiotic are noted in the description of the epiotic.

Parietal (P): The parietal, a paired bone forming the posterior roof of the neurocranium, usually forms the parietal ridge bearing parietal and nuchal spines. It articulates with the frontal anteriorly, the pterotic ventrally, the epiotic posteroventrally, and the supraoccipital both medially and posteriorly. The parietals sometimes overlap the anterior surface of the supraoccipital and interdigitate with each other, such a variation being intraspecific, as MATSUBARA (1936: 90, 1943: 75) noted.

Intercalar (IC): The relationships of the intercalar, a paired bone lying on the posterolateral face of the neurocranium, with surrounding bones are variable within scorpaenoids. The intercalar articulates with the exoccipital posteriorly and posteroventrally. In most scorpaenids (group 54 0), it meets the pterotic dorsally and the prootic posteriorly, between the pterotic and exoccipital (Fig. 25); in congiopodids and aploactinids (group 54-1), the intercalar is small, occupying a more posterior position, where it articulates anteriorly with the posterior margin of the pterotic, but is separated from the prootic by the articulation of the pterotic and exoccipital (Figs. 26, 27); in pataecids (group 54-2), the intercalar is absent (Fig. 28).

Supratemporal (ST): The supratemporal, a paired tubular bone lying over the pterotic, forms a part of the sensory canal. It articulates posteriorly with the posttemporal.

Basioccipital (BOC): The basioccipital, an unpaired bone forming the posterior base of the neurocranium, articulates with the prootic anteriorly, the parasphenoid anteroventrally, and the exoccipital dorsally. The basioccipital and exoccipitals together form a condyle for articulation with the first vertebra.

Table 12. Comparison of neurocranial characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Lateral ethmoid and prevomer	Prevomerine teeth	Basisphenoid	Epiotics of both sides	Intercalar and prootic
Sebastidae Setarchidae Neosebastidae Scorpaenidae *Pontinus* *Neomerinthe* *Phenacoscorpius* *Parascorpaena* *Scorpaena* *Iracundus* *Scorpaenopsis* *Scorpaenodes* *Hoplosebastes* Apistidae Tetrarogidae Synanceiidae *Inimicus* *Erosa* *Minous*	meet (50-0)	present (51-0)			meet (54-0)
Scorpaenidae *Pterois* *Ebosia* *Brachypterois* *Dendrochirus* *Parapterois* *Rhinopias*	separate (50-1)		present (52-0)	separate (53-0)	
Scorpaenidae *Taenianotus*					
Synanceiidae *Synanceia* *Choridactylus*		absent (51-1)			
Gnathanacanthidae	meet (50-0)				
Aploactinidae *Aploactis*					
Aploactinidae *Erisphex*		present (51-0)			
Aploactinidae *Sthenopus*	separate (50-1)				separate (54-1)
Congiopodidae *Cogiopodus*		absent (51-1)			
Congiopodidae *Zanclorhynchus*		present (51-0)	absent (52-1)	meet (53-1)	
Congiopodidae *Alertichthys*		absent (51-1)			
Pataecidae *Pataecus* *Neopataecus*		present (51-0)		separate (53-0)	intercalar is absent (54-2)
Pataecidae *Aetapcus*		absent (51-1)			

Parasphenoid (PS): The parasphenoid is an unpaired, longitudinally elongate bone along the ventral midline below the orbit. The relationship between the parasphenoid, ethmoid, prevomer, and lateral ethmoid is noted in the description of the lateral ethmoid.

2. NASAL AND CIRCUMORBITAL BONES (Figs. 1-3, 24-27; Table 13)

Nasal (N): The nasal, a paired bone lying obliquely on the anterodorsal face of the ethmoid cartilage, is in contact posteriorly with the ethmoid. It often bears a spine.

The circumorbital bones comprise the lachrymal, corresponding to infraorbital 1, infraorbitals 2 to 5, and the dermosphenotic, corresponding to infraorbital 6. These tubular or grooved bones are penetrated by the circumorbital sensory canal associated with the pterotic-supratemporal-posttemporal sensory canal.

Lachrymal (L): The lachrymal is a plate-shaped bone lying anteriorly over the maxillary on the lateral part of the snout. It meets infraorbital 2 posteriorly, and articulates with the lateral ethmoid dorsally and the anterior process of the palatine medially.

Infraorbitals (IO) 2 to 5: Infraorbital 2 is a plate-shaped bone between the lachrymal and the similarly-shaped infraorbital 3. The infraorbital stay is defined as the posterior extension of infraorbital 3 toward the preopercle. In most scorpaenoids (group 55-0), the infraorbital stay is typically formed and may or may not be articulated with the preopercle (Figs. 1A, 1C, 2A, 3A). In pataecids (group 55-1), the infraorbitals are tubular and lack an infraorbital stay (Fig. 3C). Infraorbitals 4 and 5 are posterior to the orbit between infraorbital 3 and the sphenotic. In the sebastids *Sebastes, Sebastiscus, Hozukius, Helicolenus, Adelosebastes*, and *Sebastolobus* (group 56-0), both infraorbitals 4 and 5 are present (Fig. 1A); in the sebastids *Trachyscorpia* and *Plectrogenium*, neosebastids, the scorpaenids *Pontinus, Neomerinthe, Parascorpaena, Scorpaena, Iracundus, Scorpaenopsis*, and *Scorpaenodes*, the apistid, tetrarogids, synanceiids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 56-1), one of these bones is absent (Figs. 2A, 3C); in setarchids, the scorpaenids *Phenacoscorpius, Hoplosebastes, Pterois, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus, Parapterois, Rhinopias*, and *Taenianotus*, and congiopodids (group 56-2), both infraorbitals 4 and 5 are absent (Figs. 1C, 3A). One of infraorbitals 4 or 5 was seen in *Scorpaenodes guamensis*, contrary to MATSUBARA (1943) who reported the absence of both infraorbitals 4 and 5 in that species.

Dermosphenotic (DS): The dermosphenotic, a small, grooved bone lying on the sphenotic, is present in sebastids, neosebastids, and scorpaenids except *Iracundus* (group 57-0) (Figs. 1A, C); in setarchids, the scorpaenid *Iracundus*, the apistid, tetrarogids, synanceiids, congiopodids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 57-1), it is absent (Figs. 2A, 3A, 3C).

Table 13. Comparison of infraorbital characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Infraorbital stay	Infraorbitals 4 and 5	Dermosphenotic	Infraorbital neurocranium sensory canal
Sebastidae *Sebastes* *Sebastiscus* *Hozukius* *Helicolenus* *Adelosebastes* *Sebastolobus*	formed (55-0)	both present (56-0)	present (57-0)	present (58-0)
Sebastidae *Trachyscorpia* *Plectrogenium* Neosebastidae		one absent (56-1)		
Scorpaenidae *Pontinus* *Neomerinthe* *Parascorpaena* *Scorpaena* *Scorpaenopsis* *Scorpaenodes* *Rhinopias* *Taenianotus*				absent (58-1)
Scorpaenidae *Iracundus*			absent (57-1)	
Scorpaenidae *Phenacoscorpius* *Hoplosebastes* *Pterois* *Ebosia* *Brachypterois* *Dendrochirus* *Parapterois*		both absent (56-2)	present (57-0)	
Setarchidae			absent (57-1)	
Apistidae Tetrarogidae Synanceiidae Gnathanacanthidae Aploactinidae		one absent (56-1)		present (58-0)
Congiopodidae		both absent (56-2)		
Pataecidae	absent (55-1)	one absent (56-1)		

The circumorbital bones form the circumorbital sensory canal. In sebastids, neosebastids, the apistid, tetrarogids, synanceiids, congiopodids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 58-0), the canal is present between infraorbital 3 and the temporal part of the neurocranium. In setarchids and scorpaenids (group 58-1), a canal between infraorbital 3 and the neurocranium is absent. In most fishes of group 58 0, the canal from the lachrymal branches in infraorbital 3, one branch extending to the neurocranium through infraorbitals 4 and 5, and the dermosphenotic, and the other, to the preopercle along the infraorbital stay. Among group 58-0, pataecids, which do not have the infraorbital stay (group 55-1), have an unbranched canal from the lachrymal to the neurocranium.

3. JAWS (Figs. 1-3, 5)

The upper jaw comprises the premaxillary and maxillary, and the lower jaw, the dentary, angular, and retroarticular.

Premaxillary (PM): The premaxillary forms the upper margin of the oral cavity. The ascending process of the bone has ligamentous connections with the maxillary and palatine.

Maxillary (M): The maxillary articulates with the anterior process of the palatine behind the lachrymal and has the adductor mandibulae tendinously inserted on its anterodorsal face. The maxillary head has ligamentous connections with the ethmoid and premaxillary.

Dentary (D): The dentary, a large bone forming the lower margin of the oral cavity, articulates with the angular posteriorly. The aw element of the adductor mandibulae develops on its medial face.

Angular (AN): The angular occupies the posterior part of the lower jaw and articulates with the quadrate through a condyle formed on its posterodorsal angle. The medial face of the angular is covered by the aw element of the adductor mandibulae.

Retroarticular (RA): The retroarticular is a small bone on the posteroventral corner of the lower jaw, meeting the posteroventral part of the angular. It is ligamentously connected to the interopercle.

4. SUSPENSORIUM (Figs. 4, 5; Table 14)

The suspensorium comprises seven palatal arch elements: the palatine, quadrate, metapterygoid, ectopterygoid, entopterygoid, hyomandibular, and symplectic, and four opercular elements: the preopercle, opercle, interopercle, and subopercle.

Palatine (PL): The palatine, forming the anteriormost part of the suspensorium, articulates anteriorly with the maxillary head, and meets the entopterygoid

posterodorsally and the ectopterygoid posteroventrally. In sebastids, setarchids, the neosebastid *Neosebastes*, the scorpaenids *Pontinus*, *Neomerinthe*, *Phenacoscorpius*, *Parascorpaena*, and *Scorpaena*, the apistid, and tetrarogids except *Liocranium* (group 59-0), the palatine has a villiform tooth band (Fig. 5A, B); in the neosebastid *Maxillicosta*, the scorpaenids *Iracundus*, *Scorpaenopsis*, *Scorpaenodes*, *Hoplosebastes*, *Pterois*, *Ebosia*, *Brachypterois*, *Dendrochirus*, *Parapterois*, *Rhinopias*, and *Taenianotus*, the tetrarogid *Liocranium*, synanceiids, congiopodids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 59-1), the palatine is not toothed (Fig. 5C-E).

Quadrate (Q): The quadrate, a plate-shaped, triangular bone in the ventral part of the suspensorium, articulates with the ectopterygoid anteriorly, the entopterygoid and metapterygoid dorsally through cartilage, and the anterior end of the preopercle posteroventrally. The medial side of the posterior part of the quadrate is grooved, for insertion of the posterior part of the symplectic. The ventral corner of the quadrate articulates with the angular condyle.

Metapterygoid (MTP): The metapterygoid, a plate-shaped bone articulating with the entopterygoid anteriorly, the quadrate ventrally through cartilage, the symplectic posteroventrally, and the hyomandibular posterodorsally, has the adductor arcus palatini inserted on its dorsomedial face. In most scorpaenoids (group 60-0), a space between the metapterygoid and hyomandibular allows the medial part of the levator arcus palatini fiber bundle to pass through the posteromedial face of the metapterygoid or anteromedial face of the hyomandibular (Fig. 5A, B, D); in the synanceiids *Synanceia*, *Erosa*, and *Minous*, the congiopodid *Congiopodus*, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 60-1), the space is closed (Fig. 5C, E).

Ectopterygoid (ECP): The ectopterygoid, a small, crescent-shaped bone with a pointed, ventral end, articulates with the palatine anterodorsally, the entopterygoid dorsally, and the quadrate posteroventrally.

Ectopterygoid (ENP): The entopterygoid is a plate-shaped bone meeting the palatine anteriorly, the ectopterygoid anteroventrally, and the metapterygoid posteriorly. The relationship between the entopterygoid and the adductor arcus palatini is noted in the description of the muscle (groups 7-0, 7-1, 7-2, and 7-3). In group 7-0, the dorsal margin of the entopterygoid is convex, with the adductor arcus palatini covering most of the dorsolateral face of the bone (Fig. 5A); in groups 7-1 and 7-2 the dorsal margin of the bone is straight or slightly concave, with the above muscle covering less than half of its surface or reaching its dorsal margin (Fig. 5B, E); in group 7-3, the muscle fibers extend to a longitudinal ridge present on the medial face of the entopterygoid (Fig. 5C, D).

Hyomandibular (HM): The hyomandibular is a strongly-built bone with a long ventral

process. Its relationship with the metapterygoid is noted in the description of the latter. The dorsal margin of the hyomandibular articulates with the capsule formed by the sphenotic and pterotic. Posteriorly the hyomandibular articulates with the opercle. It is

Table 14. Comparison of suspensorial characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Palatine teeth	Space between hyomadibular and metapterygoid
Sebastidae Setarchidae Neosebastidae *Neosebastes* Scorpaenidae *Pontinus* *Neomerinthe* *Phenacoscorpius* *Parascorpaena* *Scorpaena* Apistidae Tetraogidae except *Liocranium*	present (59-0)	
Neosebastidae *Maxillicosta* Scorpaenidae *Iracundus* *Scorpaenopsis* *Scorpaenodes* *Hoplosebastes* *Pterois* *Ebosia* *Brachypterois* *Dendrochirus* *Parapterois* *Rhinopias* *Taenianotus* Tetrarogidae *Liocranium* Synaceiidae *Inimicus* *Choridactylus* Congiopodidae *Alertichthys* *Zanclorhynchus*	absent (59-1)	open (60-0)
Synanceiidae *Synanceia* *Erosa* *Minous* Congiopodidae *Congiopodus* Gnathanacanthidae Aploactinidae Pataecidae		closed (60-1)

overlapped posteroventrally by the preopercle. The ventral process of the hyomandibular is cartilaginous, being connected with the dorsal end of the symplectic.

Symplectic (SY): The symplectic is rod-shaped, with the anteroventral part inserted on the ventromedial groove of the quadrate, and the posterodorsal part articulating with the metapterygoid dorsally and the hyomandibular through cartilage.

Preopercle (POP): The preopercle is a large, crescentic bone lying posterolaterally to the palatal arch. Usually five strong, backwardly or downwardly directed spines are present on the posterior side. The preopercle overlaps the anterior margin of the opercle posterodorsally and the anterodorsal margin of the interopercle posteroventrally. Its dorsomedial and ventromedial faces are firmly attached to the posteroventral face of the hyomandibular and the posteroventral margin of the quadrate, respectively. The a1 section of the adductor mandibulae and the levator arcus palatini are inserted on the preopercle anterolateral face.

Opercle (OP): The opercle is a large, plate-shaped bone, articulating anteriorly with the hyomandibular. The dilatator operculi is inserted on its anterodorsal margin.

Interopercle (IOP): The interopercle is a plate-shaped bone lying posteroventrally to the preopercle and ligamentously connected to the retroarticular.

Subopercle (SOP): The subopercle is a flat, V-shaped bone lying ventrally to the opercle.

5. HYOID ARCH (Figs. 6–8, 29; Table 15)

The hyoid arch, which corresponds to the second visceral arch, is composed of seven elements: the interhyal, epihyal, ceratohyal, hypohyal, basihyal, urohyal, and branchiostegal ray. Only the basihyal and urohyal are unpaired.

Interhyal (IH): The interhyal is a rod-shaped bone lying at the posterodorsal end of the hyoid arch, and connected with the posterodorsal end of the epihyal ventrally. The dorsal part of the interhyal is cartilaginous and connected with the medial face of the symplectic and the hyomandibular.

Epihyal (EH): The epihyal is a triangular bone connected with the ceratohyal anteriorly through cartilage. The two posteriormost branchiostegal rays are connected with its ventromedial margin.

Ceratohyal (CH): The ceratohyal is a triangular bone connected with the dorsal and ventral hypohyals anteriorly, and the epihyal posteriorly through cartilage. The branchiostegal rays except the two posteriormost are connected with the ventromedial margin of the ceratohyal.

Hypohyal (HH): The hypohyals comprise both dorsal and ventral elements, which are connected to each other and with the ceratohyal through cartilage.

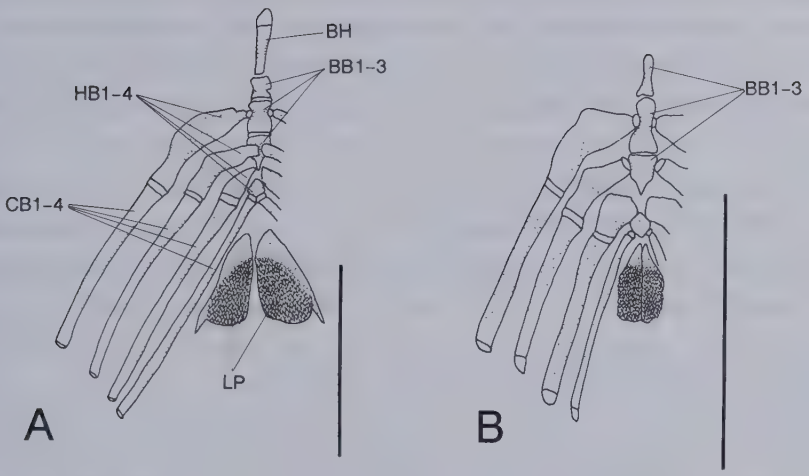


Fig. 29. Dorsal view of ventral branchial arches: A, *Parascorpaena aurita*; B, *Sthenopus mollis*.

Table 15. Comparison of hyoid arch characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Bathyhyal	Number of branchiostegal rays
Sebastidae Setarchidae Neosebastidae Scorpaenidae Apistidae Tetrarogidae Synanceiidae except *Choridactylus*	present (61-0)	7 (62-0)
Congiopodidae *Alertichthys* *Zanclorhynchus* Aploactinidae *Aploactis* *Erisphex*		6 (62-1)
Synanceiidae *Choridactylus* Gnathanacanthidae	absent (61-1)	7 (62-0)
Aploactinidae *Sthenopus* Pataecidae		6 (62-1)
Congiopodidae *Congiopodus*		5 (62-2)

Basihyal (BH): Most scorpaenoids (group 61-0) have a flat, rod-shaped basihyal (Fig. 29A); the synanceiid *Choridactylus*, the congiopodid *Congiopodus*, the gnathanacanthid, the aploactinid *Erisphex*, and pataecids (group 61-1) lack this bone (Fig. 29B).

Urohyal (UH): The urohyal is an unpaired bone, lacking any articulation with the other hyoid arch bones. The sternohyoideus originates from its posterodorsal face.

Branchiostegal ray (BR): The number of branchiostegal rays is variable among scorpaenoids. It is seven in most (group 62-0); six in the congiopodids *Alertichthys* and *Zanclorhynchus*, aploactinids, and pataecids (group 62-1); and five in the congiopodid *Congiopodus* (group 62-2).

6. BRANCHIAL ARCHES (Figs. 29, 30; Table 16)

The branchial apparatus consists of five arches, which correspond to the third to seventh visceral arches. The first to third arches comprise the pharyngobranchial, epibranchial, ceratobranchial, hypobranchial, and basibranchial. The fourth arch comprises the upper pharyngeal, formed by fusion of pharyngobranchials 4 and 5, the epibranchial, and ceratobranchial. The fifth arch comprises the lower pharyngeal, formed by fusion of ceratobranchial 5 and hypobranchial 5. Only the basibranchial is unpaired.

Pharyngobranchial (PB): The pharyngobranchial is the uppermost bone of the first to fourth branchial arches. Pharyngobranchial 1 is rod-shaped and articulates with epibranchial 1 through cartilage. Most scorpaenoids (group 63-0) have pharyngobranchial 1 (Fig. 30A-D); the congiopodids *Alertichthys* and *Zanclorhynchus* (group 63-1) do not (Fig. 30E). Pharyngobranchials 4 and 5 are fused to form the upper pharyngeal bone (UP). Pharyngobranchials 2 and 3, and the upper pharyngeal are connected through cartilage

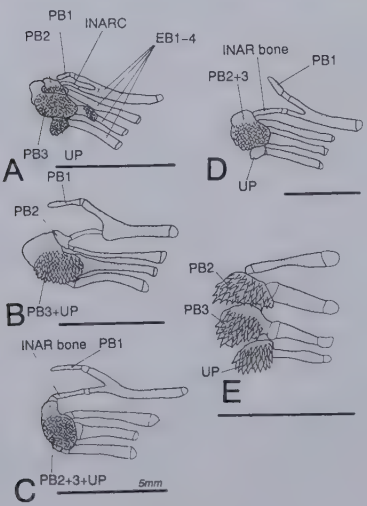


Fig. 30. Ventral view of left side of dorsal branchial arches: A, *Parascorpaena aurita*; B, *Richardsonichthys leucogaster*; C, *Erisphex potti*; D, *Inimicus japonicus*; E, *Zanclorhynchus spinifer*.

with epibranchials 2 to 4, respectively. The relationship between pharyngobranchials 2 and 3, and the upper pharyngeal is variable in scorpaenoids. In most scorpaenoids (group 64-0), pharyngobranchial 2 is separate from pharyngobranchial 3 or its complex with the upper pharyngeal (Fig. 30A, B, E); in the synanceiid *Inimicus* (group 64 - 1), pharyngobranchials 2 and 3 are fused, but pharyngobranchial 2 + 3 and the upper pharyngeal are separate (Fig. 30D); in the synanceiids *Choridactylus* and *Minous*, aploactinids, and pataecids (group 64 - 2), pharyngobranchials 2 and 3, and the upper pharyngeal are fused (Fig. 30C). In most genera of group 64-0 and the synanceiid *Inimicus* (group 65-0), pharyngobranchial 3 and the upper pharyngeal are separate (Fig. 30A, E); in the sebastid *Plectrogenium*, the scorpaenid *Dendrochirus*, the tetrarogids *Liocranium* and *Richardsonichthys*, the synanceiid *Synanceia*, and the gnathanacanthid (group 65 - 1), pharyngobranchial 3 and the upper pharyngeal are fused (Fig. 30B). In sebastids, setarchids, the neosebastid *Neosebastes*, the scorpaenids *Parascorpaena, Scorpaena, Iracundus, Scorpaenopsis, Scorpaenodes, Hoplosebastes, Pterois, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus, Rhinopias*, and *Taenianotus*, the apistid, the tetrarogids *Gymnapistes, Centropogon*, and *Notesthes*, and congiopodids (group 66 0), pharyngobranchial 2 is toothed on the ventral face (Fig. 30A, E); in the scorpaenids *Pontinus, Neomerinthe, Phenacoscorpius*, and *Parapterois*, the tetrarogids *Neocentropogon, Ocosia, Paracentropogon, Hypodytes, Liocranium, Ablabys*, and *Richardsonichthys*, synanceiids, congiopodids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 66 - 1), the separated pharyngobranchial 2 is not toothed nor is a separate tooth plate present on the fused pharyngobranchial complex (Fig. 30B-D).

Epibranchial (EB): The epibranchial is a rod-shaped bone between the pharyngobranchial and ceratobranchial, to which it is connected through cartilage. In sebastids, setarchids, neosebastids, scorpaenids, the apistid, and the tetrarogids *Gymnapistes, Centropogon, Notesthes, Neocentropogon*, and *Ocosia* (group 67 - 0), epibranchial 3 is toothed (Fig. 30A); in the tetrarogids *Paracentropogon, Hypodytes, Liocranium, Ablabys*, and *Richardsonichthys*, synanceiids, congiopodids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 67 1), epibranchial 4 is not toothed (Fig. 30B-E).

Interarcual cartilage (INARC): In most scorpaenoids (group 68 0), a process of epibranchial 1 is well developed, with an interarcual cartilage being present between the former and pharyngobranchial 2 or its complex (Fig. 30A - D); in the scorpaenid *Scorpaenopsis* and the aploactinid *Aploactis* (group 68 1), this cartilage is absent, epibranchials 1 and 2 being articulated directly (Fig. 30E). In most of group 68-0, the interarcual cartilage is unossified (group 69 0) (Fig. 30A, B); in the synanceiids *Inimicus*,

Table 16. Comparison of branchial arch characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Pharyngobranchial 1	Pharyngobranchials 2,3 and upper pharyngeal		Teeth on pharyngobranchial 2	Teeth on epibranchial 4	Interarcual cartilage	
Sebastidae except *Plectrogenium* Setarchidae Neosebastidae *Neosebastes* Scorpaenidae *Parascorpaena* *Scorpaena* *Iracundus* *Scorpaenodes* *Hoplosebastes* *Pterois* *Ebosia* *Brachypterois* *Rhinopias* *Taenianotus* Apistidae Tetrarogidae *Gymnapistes* *Centropogon* *Notesthes*	present (63-0)	2 and 3 separate (64-0)	3 and upper pharyngeal separate (65-0)	present (66-0)	present (67-0)	prsent (68-0)	unossified (69 0)
Sebastidae *Plectrogenium* Scorpaenidae *Dendrochirus*			3 and upper pharyngeal fused (65-1)				
Scorpaenidae *Scorpaenopsis*						absent (68-1)	
Neosebastidae *Maxillicosta* Scorpaenidae *Pontinus* *Neomerinthe* *Phenacoscorpius* *Parapterois* Tetrarogidae *Neocentropogon* *Ocosia*			3 and upper pharyngeal separate (65-0)	absent (66-1)		present (68-0)	unossified (69-0)
Tetrarogidae *Paracentropogon* *Hypodytes* *Ablabys* Synaceiidae *Erosa*					absent (67-1)		
Tetrarogidae *Liocranium* *Richardsonichthys* Synanceiidae *Synanceia* Gnathanacanthidae			3 and upper pharyngeal fused (65-1)				
Pataecidae		2,3, and upper pharygeal fused (64-2)					
Synanceiidae *Inimicus*		2 and 3 fused (64-1)	3 and upper pharyngeal separate (65-0)				
Synanceiidae *Choridactylus* *Minous* Aploatinidae *Erisphex* *Sthenopus*		2,3, and upper pharyngeal fused (64-2)					ossified (69-1)
Aploactinidae *Aploactis*						absent 68 1	
Congiopodidae *Congiopodus*	absent (63 1)	2 and 3 separate (64-0)	3 and upper pharyngeal separete (65-0)	present (66-0)		present 68 0	unossified (69-0)
Congiopodidae *Alerichthys* *Zanclorhynchus*							

Choridactylus, and *Minous*, and the aploactinids *Erisphex* and *Sthenopus* (group 69-1), it is ossified (Fig. 30C, D).

Ceratobranchial (CB): Ceratobranchials 1 to 4 are rod-shaped bones. Ceratobranchials 1 to 3 lying between the epibranchials and the basibranchials of the same arch, connected through cartilage, and ceratobranchial 4 lying between epibranchial 4 and the cartilage posterior to the basibranchial.

Hypobranchial (HB): Hypobranchials 1 to 3 are unpaired, rod-shaped bones lying between the ceratobranchials and the basibranchials.

Basibranchial (BB): Basibranchials 1 to 3 are unpaired rod-shaped bones lying in the ventral midline.

Lower pharyngeal (LP): Ceratobranchial 5 and hypobranchial 5 are fused to form the lower pharyngeal. This bears a villiform tooth band on its dorsal face.

7. VERTEBRAE AND ASSOCIATED BONES (Table 17)

Because of the close association of the anterior abdominal vertebrae and the anterior dorsal proximal pterygiophores, the relationship between these elements is treated in the description of the proximal pterygiophores.

Abdominal vertebrae (AV) and caudal vertebrae (CV): The vertebrae are divided into two groups, abdominal vertebrae and caudal vertebrae, the former being distinguished from the latter by the presence of lateral parapophyses and the absence of a hemal arch. The proximal pterygiophore of the anal spine s inserted between the last abdominal vertebrae and the first caudal vertebrae. In setarchids and scorpaenids except *Phenacoscorpius* (group 70 0), the usual number of vertebrae is 24, although some individual variations are often observed; in sebastids, neosebastids, the scorpaenid *Phenacoscorpius*, the apistid, tetrarogids except *Richardsonichthys*, the synanceiids except *Synanceia*, congiopodids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 70-1), the usual number of vertebrae is 25 or more. Although the tetrarogid *Richardsonichthys* and the synanceiid *Synanceia* usually have 24 vertebrae, these genera are included in group 70-R, for the reason given under "Character analysis." A few posteriormost vertebrae are described in the section dealing with the caudal skeleton.

Pleural rib (PR): In most scorpaenoids (group 71-0), pleural ribs are present on most abdominal vertebrae except the several anteriormost; in aploactinids (group 71 1), pleural ribs are absent.

Epipleural (EP): The epipleurals are supported by the anteriormost vertebra, the anterior epipleurals being connected to the side of the corresponding vertebra, the middle epipleurals to the corresponding pleural rib, and the posterior epipleurals to the

Table 17. Comparison of vertebral and associated bone characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Usual number of vertebrae	Pleural ribs
	(70-0)	
Setarchidae	24	
Scorpaenidae except *Phenacoscorpius*	24	
	(70-1)	
Sebastidae		
Sebastes	26-30	
Sebastiscus	25	
Hozukius	26	
Helicolenus	25	
Adelosebastes	26	
Sebastolobus	29	
Trachyscorpia	25-26	
Plectrogenium	26	
Neosebastidae		
Neosebastes	27	
Maxillicosta	26	
Scorpaenidae		
Phenacoscorpius	25	
Apistidae	26	
Tetrarogidae		
Gymnapistes	27	present (71-0)
Centropogon	27	
Notesthes	28	
Neocentropogon	25	
Ocosia	28	
Paracentropogon	26	
Hypodytes	26	
Liocranium	25	
Ablabys	28	
Richardsonichthys	24 (see text)	
Synanceiidae		
Inimicus	25	
Synanceia	24 (see text)	
Erosa	25	
Choridactylus	26	
Minous	25-27	
Congiopodidae		
Congiopodus	36	
Alertichthys	32	
Zanclorhynchus	35	
Gnathanacanthidae	29	
Pataecidae		
Pataecus	36	
Aetapcus	36	
Neopataecus	35	
Aploactinidae		
Aploactis	29	absent (71-1)
Erisphex	28	
Sthenopus	26	

parapophyses of the abdominal vertebrae.

8. CAUDAL SKELETON (Fig. 20; Table 18)

The caudal skeleton is composed of five elements: the urostyle, uroneural, epural,

parhypural, and hypural. The uroneural only is paired. Preural vertebrae 1 and 2 also support the caudal fin.

Preural vertebra 2 (PV2): Preural vertebra 2 corresponds to preural centrum 3. In sebastids, setarchids, neosebastids, scorpaenids, the apistid, tetrarogids, the synanceiids *Synanceia* and *Erosa*, and the congiopodids *Congiopodus* and *Zanclorhynchus* (group 72-0), the centrum and hemal spine of preural vertebra 2 are autogenous (Fig. 20A-D); in the synanceiids *Inimicus, Choridactylus*, and *Minous*, the congiopodid *Alertichthys*, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 72-1), these elements are fused (Fig. 20E-H).

Preural vertebra 1 (PV1): Preural vertebra 1 corresponds to preural centrum 2. In most scorpaenoids (group 73-0), the centrum and hemal spine of preural vertebra 1 are autogenous (Fig. 20A-E, G); in the gnathanacanthid and pataecids (group 73-1), these elements are fused (Fig. 20F, H). In sebastids, setarchids, neosebastids, scorpaenids, the apistid, and tetrarogids (group 74-0), the neural spine of preural vertebra 1 is short (Fig. 20A-D); in synanceiids, congiopodids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 74 1), the spine is long, extending to the base of the caudal fin rays (Fig. 20E-H).

Urostyle (US): The urostyle is a triangular bone formed by the fusion of preural centrum 1 and several ural centra. In most scorpaenoids (group 75-0), the urostyle and uroneural are autogenous (Fig. 20A-G); in the synanceiids *Inimicus* and *Erosa*, the congiopodids *Congiopodus* and *Alertichthys*, and pataecids (group 75-1), they are fused (Fig. 20H). In most scorpaenoids (group 76-0), the urostyle and parhypural are autogenous (Fig. 20A E, G); in the gnathanacanthid and pataecids (group 76-1), they are fused (Fig. 20F, H). In sebastids, setarchids, neosebastids, scorpaenids, the apistid, tetrarogids, the synanceiids *Synanceia, Erosa*, and *Choridactylus*, and the aploactinids *Aploactis* and *Sthenopus* (group 77-0), the urostyle and hypurals are autogenous (Fig. 20A-E); in the synanceiids *Inimicus* and *Minous*, congiopodids, the gnathanacanthid, the aploactinid *Erisphex*, and pataecids (group 77-1), they are fused (Fig. 20F-H).

Uroneural (UN): The uroneural is a small, paired bone, lying dorsally to the urostyle.

Epural (EU): The epurals, which have originated from the neural spines of the ural vertebrae, are plate-shaped bones lying dorsally to the uroneural and uppermost hypural. The epurals support the base of the procurrent rays of the upper lobe of the caudal fin. Sebastids, setarchids, neosebastids, scorpaenids, the apistid, tetrarogids, the synanceiids *Synanceia, Choridactylus*, and *Minous*, and aploactinids (group 78 0) have three epurals (Fig. 20A - E, G); the synanceiids *Inimicus* and *Erosa*, congiopodids, and the gnathanacanthid (group 78 1) have two epurals (Fig. 20F); pataecids (group 78-2) have one epural (Fig. 20H).

Table 18. Comparison of caudal skeleton characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Centrum and hemal spine of preural vertebra 2	Centrum and hemal spine of preural vertebra 1	Preural vertebra 1 neural spine	Urostyle and uroneural	Urostyle and parhypural	Urostyle and hypural	Number of epurals	Parhypural and hypurals	Number of hypurals	Caudal fin rays
Sebastidae *Trachyscorpia* *Plectrogenium* Setarchidae Neosebastidae									2+3 (80 0)	
Scorpaenidae *Pontinus* *Neomerinthe* *Scorpaenodes* *Hoplosebastes* *Pterois* *Ebosia* *Brachypterois* *Dendrochirus* *Parapterois*								autogenous (79-0)	1+3 (80-1)	
Sebastidae *Sebastes* *Sebastiscus* *Hozukius* *Helicolenus* *Adelosebastes* *Sebastolobus* Scorpaenidae *Phenacoscorpius* *Parascorpaena* *Scorpaena* *Iracundus* *Scorpaenopsis* *Rhinopias* *Taenianotus*	autogenous (72-0)		short (74-0)	autogenous (75-0)		autogenous (77 0)	3 (78-0)		1+2 (80-2)	branched (81-0)
Apistidae Tetrarogidae except *Richardsonichthys*		autogenous (73-0)			autogenous (76-0)					
Tetrarogidae *Richardsonichthys*									1+1 (80-3)	
Synanceiidae *Choridactylus*										
Aploactinidae *Aploactis*	fused (72-1)								1+2 (80 2)	
Synanceiidae *Minous*						fused (77-1)				unbranched (81 1)
Aploactinidae *Sthenopus*						autogenous (77-0)				
Synanceiidae *Synanceia*	autogenous (72-0)							fused (79-1)		branched (81-0)
Aploactinidae *Erisphex*	fused (72-1)					fused (77-1)				unbranched (81-1)
Synanceiidae *Erosa*			long (74-1)	fused (75-1)		autogenous (77-0)				branched (81 0)
Congiopodidae *Zanclorhynchus*	autogenous (72-0)			autogenous (75-0)					1+1 (80+3)	unbranched (81-1)
Congiopodidae *Congiopodus*							2 (78-1)			branched (81-0)
Synanceiidae *Inimicus*				fused (75-1)		fused (77-1)				
Congiopodidae *Alertichthys*	fused (72-1)									
Gnathanacanthidae		fused (73-1)		autogenous (75-0)	fused (76-1)					unbranched (81-1)
Pataecidae				fused (75-1)			1 (78-2)			

Parhypural (PHU): The parhypural, corresponding to the hemal spine of preural centrum 1, has the hypurapophysis on its anterolateral face. In sebastids, setarchids, neosebastids, and scorpaenids (group 79-0), the parhypural and lowermost hypural are autogenous (Fig. 20A - C); in the apistid, tetrarogids, synanceiids, congiopodids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 79 1), they are fused (Fig. 20D-H).

Hypural (HU): The hypurals, which have originated from the hemal spines of the ural vertebrae, are plate-shaped bones with a cartilaginous posterior margin. Hypurals 1 and 2 support the lower lobe, and 3 to 5, the upper lobe of the caudal fin. The hypurals are often fused to one another. The hypural formula, defined as the number of bones supporting the lower lobe + the number of bones supporting the upper lobe of the caudal fin, is 2+3 in the sebastids *Trachyscorpia* and *Plectrogenium*, setarchids, and neosebastids (group 80 - 0)(Fig. 20A); in the scorpaenids *Pontinus, Neomerinthe, Scorpaenodes, Hoplosebastes, Pterois, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus*, and *Parapterois* (group 80 1), it is 1 + 3 (Fig. 20B); in the sebastids *Sebastes, Sebastiscus, Hozukius, Helicolenus, Adelosebastes*, and *Sebastolobus*, the scorpaenids *Phenacoscorpius, Parascorpaena, Scorpaena, Iracundus, Scorpaenopsis, Rhinopias*, and *Taenianotus*, the apistid, tetrarogids except *Richardsonichthys*, the synanceiids *Choridactylus* and *Minous*, and the aploactinid *Aploactis* (group 80-2), it is 1+2 (Fig. 20C-E); in the tetrarogid *Richardsonichthys*, the synanceiids *Inimicus, Synanceia*, and *Erosa*, congiopodids, the gnathanacanthid, the aploactinids *Erisphex* and *Sthenopus*, and pataecids (group 80-3), it is 1+1 (Fig. 20F-H).

Caudal fin (CF): In most scorpaenoids (group 81-0), the principal caudal fin rays are branched; in the synanceiid *Minous*, the congiopodids *Alertichthys* and *Zanclorhynchus*, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 81 1), all of the caudal fin rays are unbranched.

9. PECTORAL GIRDLE (Fig. 31; Table 19)

The pectoral girdle comprises seven elements: the posttemporal, supracleithrum, cleithrum, postcleithra, scapula, coracoid, and radials. The pectoral fin rays are also described here.

Posttemporal (PT): The posttemporal, a fork-shaped bone articulating with the epiotic anteromedially and the dorsolateral face of the supracleithrum, often meets the supratemporal anteriorly.

Supracleithrum (SCL): The supracleithrum is a plate-shaped bone articulating with the posttemporal dorsolaterally and the cleithrum ventromedially. Baudelot's ligament, if present, is connected to the medial face of the supracleithrum.

Cleithrum (CL): The cleithrum is a large, curved, flat bone, forked dorsally. The lateral

face of the base articulates with the supracleithrum. The dorsal postcleithrum articulates with the medial face of the flat posterodorsal arm. The posteroventral face of the cleithrum articulates with the scapula and coracoid. The anteroventral and posterior faces of the cleithrum form the posterior limit of the sternohyoideus and the anterior limit of the hypaxialis, respectively.

Postcleithrum (PCL): In most scorpaenoids (group 82-0), two postcleithra, dorsal and ventral, are present (Fig. 31A, B). The dorsal postcleithrum is flat, articulating with the medial face of the posterodorsal arm of the cleithrum dorsally and the ventral

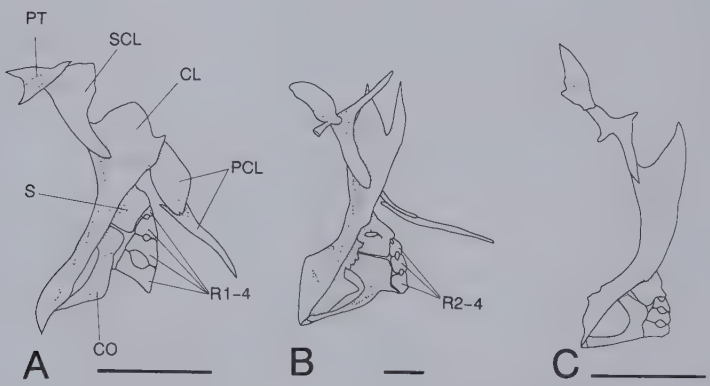


Fig. 31. Left lateral view of pectoral girdle: A, *Phenacoscorpius megalops*; B, *Gnathanacanthus goetzeei*; C, *Neopataecus waterhousii*.

postcleithrum ventrally. The relationship between the ventral postcleithrum and the obliquus inferioris is discussed in the section dealing with the obliquus inferioris. In pataecids (group 82-1), the postcleithrum is absent (Fig. 31C).

Scapula (S): The scapula is a flat, C-shaped bone articulating with the posteromedial margin of the cleithrum. In the sebastids *Sebastolobus, Trachyscorpia*, and *Plectrogenium*, setarchids, and the scorpaenids *Pontinus, Neomerinthe, Phenacoscorpius, Scorpaenodes, Hoplosebastes, Pterois, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus, Parapterois*, and *Taenianotus* (group 83-0), the scapula and uppermost radial are autogenous (Fig. 31A); in the sebastids *Sebastes, Sebastiscus, Hozukius, Helicolenus*, and *Adelosebastes*, the neosebastids, the scorpaenids *Parascorpaena, Scorpaena, Iracundus, Scorpaenopsis*, and *Rhinopias*, the apistid, tetrarogids, synanceiids, the congiopodids *Alertichthys* and *Zanclorhynchus*, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 83 1), the scapula and uppermost radial are fused (Fig. 31B, C). Although in the congiopodid *Congiopodus* the scapula and uppermost radial are autogenous, the genus is included in group 83 R, for the reason given

Table 19. Comparison of pectoral girdle characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Postcleithra	Scapula and uppermost radial	Space between coracoid and lowermost radial	Pectoral fin rays
Sebastidae *Sebastolobus* *Trachyscorpia* *Plectrogenium* Setarchidae Scorpaenidae *Neomerinthe* *Phenacoscorpius* *Scorpaenodes* *Hoplosebastes* *Ebosia* *Brachypterois* *Dendrochirus* *Parapterois*	present (82-0)	separate (83-0)	open (84-0)	branched (85-0)
Scorpaenidae *Pontinus* *Pterois* *Taenianotus*				unbranched (85-1)
Sebastidae *Sebastes* *Sebastiscus* *Hozukius* *Helicolenus* *Adelosebastes* Neosebastidae Scorpaenidae *Parascorpaena* *Scorpaena* *Iracundus* *Scorpaenopsis* *Rhinopias* Tetrarogidae Synanceiidae ' except *Minous*		fused (83-1)		branched (85-0)
Apistidae		(for *Congiopodus* see text)	closed (84-1)	
Synanceiidae *Minous* Congiopodidae *Congiopodus* *Alertichthys* *Zanclorhynchus* Aploactinidae			open (84-0)	unbranched (85-1)
Gnathanacanthidae			closed (84-1)	
Pataecidae	absent (82-1)		open (84-0)	

under "Character analysis."

Coracoid (CO): The coracoid is a curved, flat bone articulating anterodorsally and anteroventrally with the posteroventral margin of the cleithrum. In most scorpaenoids (group 84 - 0), a space between the coracoid and lowermost radial is present, accommodating the coracoradialis (Fig. 31A, C); in the apistid and gnathanacanthid (group 84-1), the space is largely closed (Fig. 31B).

Radial (R): The radials are small, flat, perichondral bones arranged along the posterior margins of the scapula and coracoid. The posterior margin of the radials forms the base of the pectoral fin rays. In group 83-0, the number of radials is four; in group 83-1, the number is three owing to the fusion of the uppermost radial with the scapula. The relationship between the lowermost radial and coracoid is noted in the description of the latter.

Pectoral fin (P1F): In sebastids, setarchids, neosebastids, scorpaenids except *Pontinus, Pterois,* and *Taenianotus*, the apistid, tetrarogids, and synanceiids except *Minous* (group 85-0), the middle rays of the pectoral fin are branched; in the scorpaenids *Pontinus, Pterois*, and *Taenianotus*, the synanceiid *Minous*, congiopodids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 85-1), the pectoral fin rays are unbranched.

10. PELVIC GIRDLE (Fig. 15; Table 20)

The pelvic fins are supported by a pair of pelvic bones.

Pelvis (P2S): The pelvis is a triangular bone, articulating with its opposite number in the ventral midline. The infracarinalis medius is connected to the posterolateral margin of this bone. In scorpaenoids except pataecids (groups 23-0, 24-0, 25-0, 26 0, 28-0, and 29-0), the pelvis is normally developed and supports the muscles serving the pelvic girdle; in pataecids (groups 23-1, 24 1, 25 1, 26-1, 28 1, and 29-1), the pelvis is, small, being flattened anteriorly and conical posteriorly (Fig. 15I).

Pelvic fin (P2F): In most scorpaenoids (group 86-0), the number of pelvic fin rays is five; four in the tetrarogids *Paracentropogon, Hypodytes*, and *Liocranium*, and the synanceiid *Erosa* (group 86 1); three in aploactinids (group 86 2); two in the pataecid *Aetapcus* (group 86 3); and one in the pataecids *Pataecus* and *Neopataecus* (group 86 4). In most scorpaenoids (group 87 0), some pelvic fin rays are branched; in the synanceiid *Minous*, congiopodids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 87-1), the pelvic fin rays are unbranched.

11. DORSAL AND ANAL FIN SUPPORTS (Figs. 32, 33; Tables 21 23)

The median fins are supported by the proximal and distal pterygiophores. The supraneural lies inside the nape in some scorpaenoids.

Table 20. Comparison of pelvic girdle characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Number of pelvic fin rays	Pelvic fin rays
Sebastidae Setarchidae Neosebastidae Scorpaenidae Apistidae Tetrarogidae *Gymnapistes* *Centropogon* *Notesthes* *Neocentropogon* *Ocosia* *Ablabys* *Richardsonichthys* Synanceiidae *Inimicus* *Synanceia* *Choridactylus*	5 (86 0)	branched (87-0)
Synanceiidae *Minous* Congiopodidae Gnathanacanthidae		unbranched (87-1)
Tetrarogidae *Paracentropogon* *Hypodytes* *Liocranium* Synanceiidae *Erosa*	4 (86-1)	branched (87-0)
Aploactinidae	3 (86-2)	unbranched (87-1)
Pataecidae *Aetapcus*	2 (86-3)	
Pataecidae *Pataecus* *Neopataecus*	1 (86-4)	

Supraneural (SN): The supraneural is an elongate, flat bone lying in interneural space 1 (between the neurocranium and neural spine 1). Sebastids except *Plectrogenium*, setarchids, and the scorpaenids *Pontinus, Neomerinthe*, and *Phenacoscorpius* (group 88-0) have a supraneural (Fig. 32A); other scorpaenoids (group 88-1) do not (Fig. 32B, C, 33).

Proximal pterygiophore (PP): The proximal pterygiophores are triangular with longitudinal keels on both sides. In the present study, the anterior series of proximal pterygiophores is coded according to the supporting spine: "proximal pterygiophore 1+2" refers to the proximal pterygiophore that supports dorsal spines 1 and 2. Because the

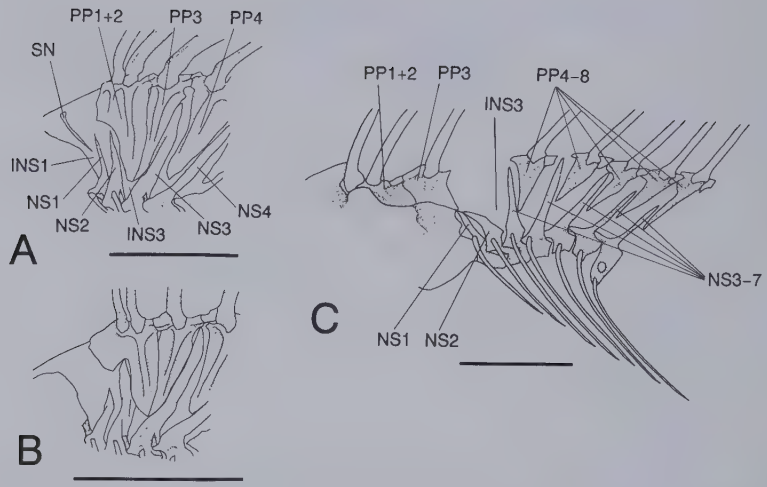


Fig. 32. Left lateral view of anterior vertebrae and dorsal fin supports: A, *Neomerinthe rufescens*; B, *Scorpaenodes kelloggi*; C, *Richardsonichthys leucogaster*.

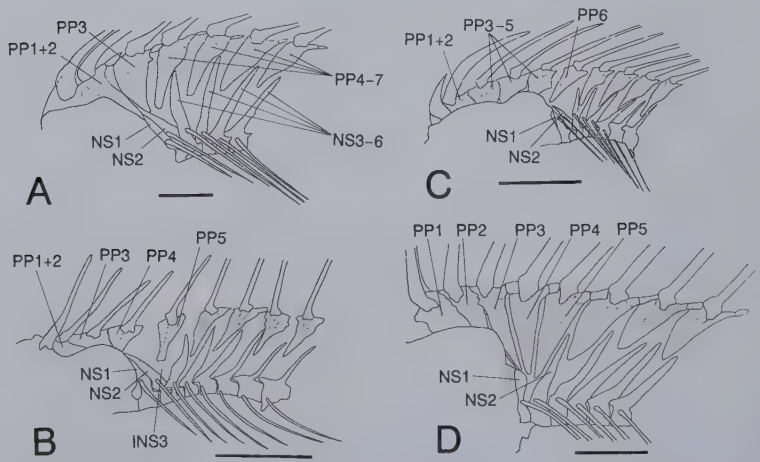


Fig. 33. Left lateral view of anterior vertebrae and dorsal fin supports: A, *Gnathanacanthus goetzeei*; B, *Erisphex potti*; C, *Pataecus fronts*; D, *Congiopodus coriaceus*.

neural spines of the anterior abdominal vertebrae are closely associated with the anterior dorsal pterygiophores, the relationships between these elements are noted below.

In sebastids, setarchids, neosebastids, scorpaenids, and the apistid (group 89-0), neural spine 1 does not articulate with the posterodorsomedial face of the neurocranium, nor does

neural spine 2 articulate with neural spine 1 (Fig. 32A, B); in congiopodids (group 89-1), neural spine 1 articulates anteriorly with the posterodorsomedial face of the neurocranium, but neural spine 2 does not articulate anteriorly with neural spine 1 (Fig. 33D); in tetrarogids, synanceiids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 89-2), neural spine 1 articulates anteriorly with the posterodorsomedial face of the neurocranium and neural spine 2 articulates anteriorly with neural spine 1 (Figs. 32C, 33A-C). Interneural spaces 1 and 2 are closed in group 89-1 except the gnathanacanthid, in which interneural space 1 is filled by the insertion of proximal pterygiophore 1+2 (Fig. 33A). In most scorpaenoids (group 90-0), neural spines 1 and 2 are normally developed compared with the following elements; in synanceiids (group 90-1), the former spines are short. In most scorpaenoids (group 91-0), the anteriormost proximal pterygiophore of the dorsal fin supports dorsal spines 1 and 2 (Figs. 32, 33A-C); in congiopodids (group 91-1), each proximal pterygiophore of the dorsal fin supports a single dorsal spine (Fig. 33D). In sebastids, setarchids, neosebastids, scorpaenids, the apistid, tetrarogids, and synanceiids (group 92-0, 93-0), proximal pterygiophores 1+2 and 3 are inserted in interneural space 3 or on the posterodorsomedial face of the neurocranium, and proximal pterygiophore 4 and succeeding proximal pterygiophores are inserted in the interneural spaces of the same number. In the gnathanacanthid (group 92-1), proximal pterygiophore 1+2 fills inter neuralspace 1, proximal pterygiophores 3 and 4 occupy interneural space 3, proximal pterygiophores 5 to 8, interneural spaces 4 to 7, respectively, and proximal pterygiophore 8 and succeeding pterygiophores, the interneural spaces of the same number; in the aploactinid *Aploactis* (group 92-2), proximal pterygiophores 1+2 and 3 are attached to the posterodorsomedial face of the neurocranium, proximal pterygiophores 4 to 8 occupy interneural spaces 3 to 7, respectively, and proximal pterygiophore 8 and succeeding pterygiophores, the interneural spaces of the same number; in the aploactinid *Erisphex* (group 92-3), proximal pterygiophores 1+2, 3, and 4 are attached to the posterodorsomedial face of the neurocranium, proximal pterygiophores 5 to 7 occupy interneural spaces 3 to 5, proximal pterygiophores 8 and 9, interneural spaces 7 and 8, and proximal pterygiophore 10 and succeeding pterygiphores, the interneural spaces of the same number; in the aploactinid *Sthenopus* (group 92-4), proximal pterygiophores 1+2, 3, and 4 are attached to the posterodorsomedial face of the neurocranium, proximal pterygiophores 5 to 8 occupy interneural spaces 3 to 6, proximal pterygiophores 9 and 10, interneural spaces 8 and 9, and proximal pterygiophore 11 and succeeding pterygiophores, the interneural spaces of the same number; in the pataecid *Aetapcus* (group 92-5), proximal pterygiophores 1+2, 3, 4, and 5 are attached to the posterodorsomedial face of the neurocranium, proximal pterygiophores 6 to 8 occupy interneural spaces 3 to 5,

proximal pterygiophores 9 and 10, interneural spaces 7 and 8, proximal pterygiophores 11 to 13, interneural spaces 10 to 12, and proximal pterygiophore 14 and succeeding pterygiophores, the interneural spaces of the same number; in the pataecid *Pataecus* (group 92 6), proximal pterygiophores 1+2, 3, 4, and 5 are attached to the posterodorsomedial face of the neurocranium, proximal pterygiophores 6 to 9 occupy interneural spaces 3 to 6, proximal pterygiophore 10, interneural space 8, proximal pterygiophores 11 to 13 interneural spaces 10 to 12, and proximal pterygiophore 14 and succeeding pterygiophores, the interneural spaces of the same number; in the pataecid *Neopataecus* (group 92-7), proximal pterygiophores 1+2, 3, 4, 5, and 6 are attached to the posterodorsomedial face of the neurocranium, proximal pterygiophores 7 to 9 occupy interneural spaces 3 to 5, proximal pterygiophore 10, interneural space 7, proximal pterygiophores 11 and 12, interneural spaces 9 and 10, proximal pterygiophores 13 and 14 interneural spaces 12 and 13, and proximal pterygiophore 15 and succeeding pterygiophores, the interneural spaces of the same number. The anterior shift of proximal pterygiophores in congiopodids is described in groups 93-1 and 93-2. In *Alertichthys* and *Zanclorhynchus* (group 93-1), proximal pterygiophores 1 and 2 occupy interneural space 2, and proximal pterygiophore 3 and succeeding pterygiophores, the interneural space of the same number; in *Congiopodus* (group 93 2), proximal pterygiophores 1 and 2 occupy interneural space 2, proximal pterygiophores 6 and 7, interneural spaces 3 and 4, respectively, proximal pterygiophore 8, interneural space 6, proximal pterygiophores 9 to 11, interneural spaces 8 to 10, and proximal pterygiophore 12 and succeeding pterygiphores, the interneural spaces of the same number.

The proximal pterygiophore supporting the anal spines is inserted between the posteriormost abdominal vertebra and the anteriormost caudal vertebra.

Distal pterygiophore (DP): The distal pterygiophores lie posteriorly to the posterodorsal end of the proximal pterygiophores supporting the spines. That supporting the posteriormost dorsal spine is ontogenetically transformed from a soft-ray in scorpaenoids.

Stay (STY): The stay is an unpaired bone lying posteriorly to the posteriormost dorsal and anal pterygiophores.

Dorsal fin (DF): In most scorpaenoids (group 94 0), the dorsal fin rays, except the anteriormost, are branched; in the synanceiid *Minous*, the congiopodids *Alertichthys* and *Zanclorhynchus*, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 94 1), the dorsal fin rays are unbranched.

Anal fin (AF): In most scorpaenoids (group 95 0), the anal fin rays are branched; in the synanceiid *Minous*, the congiopodids *Alertichthys* and *Zanclorhynchus*, the

gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids (group 95 - 1), the anal fin rays are unbranched.

Table 21. Comparison of supraneural and the neural spine characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

<table>
<tr><th>Taxon</th><th>Supraneural</th><th colspan="2">Neural spines 1 and 2</th></tr>
<tr><td>Sebastidae
except Plectrogenium
Setarchidae
Scorpaenidae
Pontinus
Neomerinthe
Phenacoscorpius</td><td>present
(88-0)</td><td rowspan="3">not articulated anteriorly
(89-0)</td><td rowspan="2">normal
(90-0)</td></tr>
<tr><td>Sebastidae
Plectrogenium
Neosebastidae
Scorpaenidae
except
Pontinus
Neomerinthe
Phenacoscorpius
Apistidae</td><td rowspan="4">absent
(88-1)</td></tr>
<tr><td>Tetrarogidae</td><td rowspan="3">neural spine 1 articulated with neurocranium, neural spine 2 articulated with neural spine 1
(89-2)</td></tr>
<tr><td>Synanceiidae</td><td>short
(90-1)</td></tr>
<tr><td>Gnathanacanthidae
Aploactinidae
Pataecidae</td><td rowspan="2">normal
(90-0)</td></tr>
<tr><td>Congiopodidae</td><td>neural spine 1 articulated with neurocranium
(89-1)</td></tr>
</table>

Table 22. Comparison of dorsal proximal pterygiophore and interneural space characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers. SN: supraneural, which is absent in group 88-1, NC: neurocranium.

Taxon	Dorsal proximal pterygiophores 1 and 2	Dorsal proximal pterygiophores (upper line) and *interneural spaces* (*lower line*)
Sebastidae Setarchidae Neosebastidae Scorpaenidae Apistidae	a single pterygiophore 1+2 supports dorsal spine 1 and 2 (91-0)	SN 1+2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 NC 1 2 *3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15* (92-0, 93-0)
Tetrarogidae Synanceiidae		1+2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 NC *3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15* (92-0, 93-0)
Gnathanacanthidae		1+2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 NC *3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15* (92-1)
Aploactinidae *Aploactis*		1+2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 NC *3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15* (92-2)
Aploactinidae *Erisphex*		1+2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 NC *3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15* (92-3)
Aploactinidae *Sthenopus*		1+2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 NC *3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15* (92-4)
Pataecidae *Aetapcus*		1+2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 NC *3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15* (92-5)
Pataecidae *Pataecus*		1+2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 NC *3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15* (92-6)
Pataecidae *Neopataecus*		1+2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 NC *3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15* (92-7)
Congiopodidae *Alertichthys* *Zanclorhynchus*	pterygiophores 1 and 2 support dorsal spines 1 and 2 respectively (91-1)	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 NC *2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15* (93-1)
Congiopodidae *Congiopodus*		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 NC *2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15* (93-2)

Table 23. Comparison of dorsal and anal fin ray characters in scorpaenoids. Numerals in parentheses correspond to group numbers.

Taxon	Dorsal fin rays	Anal fin rays
Sebastidae Setarchidae Neosebastidae Scorpaenidae Apistidae Tetrarogidae Synanceiidae except *Minous* Congiopodidae *Congiopodus*	branched (94-0)	branched (95-0)
Synanceiidae *Minous* Congiopodidae *Alertichthys* *Zanclorhynchus* Gnathanacanthidae Aploactinidae Pataecidae	unbranched (94-1)	unbranched (95-1)

IV. Phylogentic Consideration

1. CHARACTER ANALYSIS

To construct the phylogenetic relationships among the Scorpaenoidei, the cladistic method of HENNIG (1966) was adopted. Ninety-five characters were selected following the examination of the muscles and skeletons of 55 scorpaenoid genera, and character polarities are determined primarily by out-group comparison (WATROUS and WHEELER 1981, WILEY 1981). Because the Scorpaenoidei has been considered the least morphologically specialized group in the Scorpaeniformes, a suitable out-group within the order is unavailable. Many authors considered the Scorpaeniformes to have evolved from a percoid ancestor because of the similarities in external and internal characters between generalized scorpaenoids and generalized percoids (MATSUBARA 1943, QUAST 1965, GOSLINE 1971, LAUDER and LIEM 1983, WASHINGTON *et al.* 1984), although most of the above admitted possible derivation from several groups of Perciformes. Other authors have considered the Scorpaeniformes as a pre-perciform group (GREENWOOD *et al.* 1966, NELSON 1976, 1984). Although a monophyletic versus polyphyletic origin is unclear, this work accept, a percoid origin of scorpaenoids, because most of the scorpaenoid characters recognized here are comparable with those in generalized percoids, with one

condition of most characters often being considered the same as that in generalized percoids. Consequently, the out-group comparison was made primarily with generalized percoids (Katayama 1959, Gosline 1966, Greenwood 1976, Zehren 1979, Johnson 1980, 1984). If such was impossible owing to the uniqueness of the character in scorpaenoids, the unquestionably specialized conditions such as absence and fusion, were considered derived. In cases of character polarization still being unclear, the character condition in sebastids and scorpaenids, which have been considered the most morphologically primitive group in scorpaenoids (Matsubara 1943, Quast 1965, Washington *et al.* 1984), was presupposed as primitive (functional out-group, Watrous and Wheeler 1981).

The parenthesized character number and derived character condition are boldfaced before each analysis.

Muscles of the cheek

Although Allis (1909), Dietz (1914), Adamicka (1972), and Yabe (1985) examined the cheek muscles of scorpaenoids, presenting valuable information, the extent of variation in the cheek muscle structures within the scorpaenoids has not been previously shown. Eight derived characters are recognized here.

(1) A1 origin narrow: In generalized percoids, a12 originates broadly from the faces of the upper part of the preopercle and hyomandibular. In scorpaenoids, a1 and a2 are separated by ramus mandibularis 5. In group 1-0, a1 originates broadly from the faces of the upper part of the preopercle and hyomandibular, whereas in group 1-1, the a1 origin is narrow and restricted to the hyomandibular. The condition of group 1-0 is thought to be more easily transformed from that of generalized percoids and is thus considered primitive.

(2) A1 associated with infraorbital 3: In group 2-0, a1 fibers are not associated with the infraorbitals, whereas those in group 2-1 have the dorsolateral portion of the a1 origin from the medial face of infraorbital 3. Because a12 fibers of generalized percoids are not associated with the infraorbitals, that of a1 in group 2 1 is proposed as having evolved with the development of the infraorbital stay.

(3) A1 fibers shortened: In group 3 - 0, which has the usual mouth structure of scorpaenoids, a1 fibers extend well forward along the primordial ligament between the lower jaw and the maxilla, resulting in a short maxillary tendon; in group 3 1, which has a projecting mouth, a1 fibers do not extend so far forward anteriorly, the maxillary tendon therefore being long. Because a projected mouth is thought to be specialized, the condition of group 3-1 is also considered derived.

(4) A1 maxillary tendon trifid: In generalized percoids and group 4 0, including most

scorpaenoids, the a1-maxillary tendon branches anteriorly, resulting in two insertion points; in group 4-1, this tendon branches to three anterior insertion points.

(5) A23 origin shifted medially and dorsally: In group 5-0, a23 lies laterally to the levator arcus palatini; in group 5-1, the a23 origin has shifted to a medial position, sandwiching the levator arcus palatini; in group 5-2, the a23 origin has shifted even more, lying medially to the levator arcus palatini; in group 5-3, the a23 origin has shifted dorsally to the neurocranium. The condition of group 5-0 is thought to be easily transformed from that of generalized percoids. The progressive medial and dorsal shifts of the a23 origin seen in groups 5-0 to 5-3 are regarded as a transformational series.

(6) Levator arcus palatini insertion broad: In generalized percoids and group 6-0, the levator arcus palatini is inserted on the lateral face of the hyomandibular and dorsolateral margin of the metapterygoid; in group 6-1, the insertion of the levator arcus palatini includes the dorsal face of the symplectic.

(7) Adductor arcus palatini insertion shifted medially: In generalized percoids and group 7-0, the adductor arcus palatini is inserted on the posterodorsal face of the palatine and on most of the dorsolateral face of the entopterygoid; in group 7-1, the insertion covers less than half of the dorsolateral face of the crescent-shaped entopterygoid; in group 7-2, the insertion is on the dorsal margin or dorsomedial face of the crescent-shaped entopterygoid; in group 7-3, it is on the longitudinal ridge on the medial face of the entopterygoid. The medial shift of the adductor arcus palatini insertion is thought to represent increasingly derived conditions.

(8) Levator operculi origin shifted posteriorly: In generalized percoids and group 8-0, the levator operculi originates from the ventrolateral face of the pterotic; in group 8-1, its origin is branched, one from the pterotic and the other from the ventral face of the posttemporal; in group 8-2, the muscle originates only from the ventral face of the posttemporal.

Muscles of the ventral surface of the head

Although DIETZ (1914), ADAMICKA (1972), and YABE (1985) examined the muscles serving the ventral surface of the head in scorpaenoids, presenting valuable information, the extent of variation in these muscles in scorpaenoids has not been previously shown. Three derived characters are recognized here.

(9) Protractor hyoidei shortened: The posterior attachment of the protractor hyoidei is on the ventral face of the ceratohyal just anterior to the base of the fourth branchiostegal ray in group 9-0, including most scorpaenoids, the third branchiostegal ray in group 9-1, and the second branchiostegal ray in group 9-2. Group 9-0 includes all

sebastids and scorpaenids and is considered the most primitive.

(10) Hyohyoides inferioris reduced: Yabe (1985) examined the muscles of the hyoid arch of scorpaeniforms, classifying the scorpaenoids into three types with regard to the hyohyoides inferioris. Three groups based on this muscle condition 10-0, 10-1, and 10-2 are also recognized here. In group 10-0, the left and right fiber bundles of the hyohyoides inferioris cross over each other; in group 10-1, the left and right origins are tendinous and meet in the midline, from which point the fiber bundles arise; in group 10-2, the hyohyoides inferioris is absent. The muscle is thought to have been reduced as a morphological specialization in scorpaenoids, with the condition of group 10-0 being considered primitive.

(11) Anterior section of hyohyoidei abductores transformed into a raphé; this section reduced and lost: Yabe (1985) recognized three conditions of the anterior section of the hyohyoides abductores in scorpaenoids. However, five morphotypes, 11-0, 11-1, 11-2, 11-3, and 11-4 are recognized here. In group 11-0, the left and right fiber bundles cross over each other between the bases of the first branchiostegal rays; in group 11-1, these elements meet in the midline giving rise posteriorly to fiber bundles, those leading to the left branchiostegal rays being ventral to those from the left side as in group 11-0; in group 11-2, the fibers of the anterior section of the muscle meet those from the opposite side in the midline where they are in broad contact, forming a raphé; in group 11-3, the muscle fibers are absent, with only a pair of tendons remaining. The tendons originate from the midline and are inserted on the medial sides of the first branchiostegal rays; in group 11-4, this muscle section is entirely absent. The condition of group 11-0 is parallels that of generalized percoids and is therefore considered primitive.

Muscles serving the branchial arches

Although Dietz (1914), Adamicka (1972), and Yabe (1985) examined the muscles serving the branchial arches, presenting valuable information, the extent of variation in the muscles serving the branchial arches within scorpaenoids has not been previously shown. Eight derived characters are recognized here.

(12) Levator externus 3 absent: In generalized percoids and group 12-0, including most scorpaenoids, levatores externi 1 to 4 are present; in group 12-1, levator externus 3 is absent.

(13) Levator posterior absent: In generalized percoids and group 13-0, including most scorpaenoids, the levator posterior is present; in group 13-1, it is absent.

(14) Obliquus dorsalis 2 present: In group 14-0, including most scorpaenoids, only obliquus dorsalis 3 is present; in group 14-1, obliquus dorsalis 2, connecting

pharyngobranchial 2 and epibranchial 2, is also present. Obliqui dorsales 3 and 4 are known in *Elops*, but many acanthopterygians retain only obliquus dorsalis 3 (WINTERBOTTOM 1974a). Because obliquus dorsalis 2 is thought to be unique among acanthopterygians, the condition of group 14-1 is considered derived.

(15) Levator internus 3 sandwiched by obliquus dorsalis 3: In generalized percoids and group 15-0, obliquus dorsalis 3 lies posteriorly to levator internus 3, but in group 15-1, sandwiches the latter.

(16) Adductores 1 to 3 present: In generalized percoids and group 16-0, including most scorpaenoids, only adductores 4 and 5 are present; in group 16-1, adductores 1 to 5 are present.

(17) Transversus dorsalis anterior insertion unbranched: In generalized percoids and group 17-0, the insertion of the transversus dorsalis is branched into two, one being on the anterodorsal tip of pharyngobranchial 2 or its complex with pharyngobranchial 3 and the upper pharyngeal, and the other on the anterodorsal face of epibranchial 2 and sandwiched by levatores interni 2 and 3; in group 17-1, the insertion is not branched, the latter part only being present.

(18) Rectus ventralis insertion branched: In generalized percoids and group 18-0, the rectus ventralis is inserted on the anteroventral face of ceratobranchial 4; in group 18-1, the insertion of the muscle is branched, being on the anteroventral faces of ceratobranchial 4 and the lower pharyngeal.

Muscles between the pectoral girdle, neurocranium, hyoid arch, and branchial arches

YABE (1985) examined the muscles between the pectoral girdle, neurocranium, hyoid and branchial arches of scorpaenoids. Two derived characters are recognized here.

(19) Pharyngocleithralis externus origin shifted medially: In generalized percoids and group 19-0, the origin of the pharyngocleithralis externus is lateral to the origin of the sternohyoideus; in group 19-1, the origin has shifted medially, being sandwiched by the origin of the sternohyoideus; in group 19-2, the origin is dorsomedial to that of the sternohyoideus.

(20) Pharyngocleithralis internus origin bifid: In generalized percoids and group 20-0, including most scorpaenoids, the origin of the pharyngocleithralis is simple; in group 20-1, the origin is bifid.

Muscles serving the pectoral fin

The muscles serving the pectoral fin of scorpaenoids were examined by YABE (1985), but the extent of variation among scorpaenoids was not sufficiently shown. Two derived

characters are recognized here.

(21) Coracoradialis absent: In generalized percoids and group 21-0, including most scorpaenoids, the coracoradialis is present; in group 21-1, it is absent.

(22) Coracoradialis origin shifted to cleithrum: In generalized percoids and group 22-0, the coracoradialis originates only from the posteromedial face of the posterior process of the coracoid; in group 22-1, the origin includes this process, but the posterolateral face of the posteroventral process of the cleithrum is connected with the posteroventral process of the coracoid by a membrane on which rather sparse fibers run from the cleithrum to the coracoradialis; in group 22-2, the coracoradialis is short and remarkably developed between the lowermost radial and the posterolateral face of the cleithrum posteroventral process; in group 22-3, only a short coracoradialis is present.

Muscles serving the pelvic fin

Yabe (1985) examined the muscles serving the pelvic fin in several scorpaenoid genera but extent of variation within scorpaenoids was not shown. Eight derived characters are recognized, seven being concerned with the loss of muscles in pataecids.

(23) Abductor superficialis pelvicus absent: Generalized percoids and group 23-0, including most scorpaenoids, have the abductor superficialis pelvicus. It is lost in group 23-1

(24) Abductor profundus pelvicus absent: Generalized percoids and group 24-0, including most scorpaenoids, have the abductor profundus pelvicus. It is lost in group 24-1.

(25) Arrector ventralis pelvicus absent: Generalized percoids and group 25-0, including most scorpaenoids, have the arrector ventralis pelvicus. It is lost in group 25-1.

(26) Adductor superficialis pelvicus absent: Generalized percoids and group 26-0, including most scorpaenoids, have the adductor superficialis pelvicus. It is lost in group 26-1.

(27) Adductor superficialis pelvicus fibers fused to those of adductor profundus pelvicus: In generalized percoids and group 27-0, including most scorpaenoids, the adductor superficialis pelvicus and adductor profundus pelvicus are separate, but are united in group 27-1.

(28) Adductor profundus pelvicus absent: Generalized percoids and group 28-0, including most scorpaenoids, have the adductor profundus pelvicus. It is lost in group 28-1.

(29) Arrector dorsalis pelvicus absent: Generalized percoids and group 29-0, including most scorpaenoids, have the arrector dorsalis pelvicus. It is lost in group 29-1.

(30) Extensor proprius absent: Generalized percoids and group 30-0, including most scorpaenoids, have the abductor superficialis pelvicus. It is lost in group 30-1.

Muscles serving the dorsal and anal fins

Despite the morphological interest in the anterior shift of the dorsal fin to the neurocranium in scorpaenoids, few studies have been made on the muscles serving the dorsal and anal fins, except RYBACHUK (1979) examining dorsal fin muscles in *Sebastes*. One derived character is recognized here.

(31) Inclinator dorsalis 1 reduced to tendon: In group 31 0, which has the dorsal fin well separated from the posterodorsal end of the neurocranium, fibers of inclinator dorsalis 1 are normally developed as in generalized percoids; in group 31-1, which has the dorsal fin originating above the neurocranium, the fibers of this muscle are reduced, with only a tendon remaining.

Carinal muscles

No comprehensive studies on the carinal muscles of scorpaenoids have been previously made. Two derived characters are recognized here.

(32) Supracarinalis anterior absent: Group 32-0, including most scorpaenoids, have the supracarinalis anterior, which has been lost by group 32-1. This character is apparently associated with the origin of the dorsal fin above the neurocranium, but some tetrarogids with the specialized dorsal fin condition have retained the primitive muscle character.

(33) Lateral branch of infracarinalis medius attached to pelvic girdle: In generalized percoids and group 33 0, the anterior limit of the infracarinalis medius is simple, being connected with the posterior process of the pelvic girdle; in group 33-1, it is divided the medial branch extending to the pelvic girdle as in group 33-0 and the lateral branch being attached to the ventral face of the base of the pelvic girdle or pelvic spine.

Muscles serving the caudal fin

RYBACHUK (1976) and YABE (1985) examined the muscles serving the caudal fin of several scorpaenoid genera. Two derived characters are recognized here.

(34) Flexor ventralis externus absent: In generalized percoids and group 34 0, including most scorpaenoids, the flexor ventralis externus is present. It is lost in group 34-1.

(35) Adductor dorsalis absent: Generalized percoids and group 35-0 have the adductor dorsalis. It is lost in group 35-1.

Body muscles

YABE (1985) examined the body muscles of scorpaeniforms, showing the insertion of the obliquus superioris on the posteroventral face of the neurocranium to be primitive. Two further derived characters of the obliquus superioris and three of the obliquus inferioris

are recognized here.

(36) Obliquus superioris lying ventrally to Baudelot's ligament, if present: In group 36 0, the obliquus superioris from the posterior face of the neurocranium is penetrated by Baudelot's ligament; in group 36 1, the muscle bypasses the latter, lying ventrally to it. Group 36 0 includes sebastids and those scorpaenids with an apparently non-specialized swimbladder. Accordingly, their condition is considered primitive. Congiopodids have lost Baudelot's ligament.

(37) Obliquus superioris connected with supracleithrum: In group 37-0, including most scorpaenoids, the obliquus superioris from the posterior face of the neurocranium is not directly connected with the supracleithrum, being associated either through Baudelot's ligament or no at all; in group 37-1, the lateral part of the muscle is connected with the supracleithrum; in group 37-2, the entire muscle is connected with the supracleithrum. Because group 37-0 includes sebastids and scorpaenids, its condition is considered primitive.

(38) Plate-shaped element of obliquus inferioris between ventral postcleithrum and coracoid absent: Group 38-0, including most scorpaenoids, has a plate-shaped element of the obliquus inferioris lying laterally to the main muscle between the ventral postcleithrum and coracoid; such an element is absent in group 38-1. The variation of this element in percoids is not clear. Because group 38-0 includes most scorpaenoids, except congiopodids which have an undoubtedly specialized pectoral fin, its condition is considered primitive.

(39) Plate-shaped element of obliquus inferioris between ventral postcleithrum and coracoid tendinous: Group 38-0 is divided into two groups by character 39. In group 39-0, insertion of the above element on the coracoid is by rather broad muscle fibers; in group 39 1, the insertion is tendinous. Group 39 0, including all sebastids and most scorpaenids, is considered primitive.

(40) Anteroventral limit of the obliquus inferioris shifted posteriorly: In generalized percoids and group 40-0, including most scorpaenoids, the anteroventral limit of the main part of the obliquus inferioris is the posteroventral face of the cleithrum, ventral to the abductor profundus; in group 40-1, the anteroventral limit is the ventrolateral margin of the anteroventral arm of the coracoid; in group 40-2, the anteroventral part of the muscle is divided into two branches lying laterally to each other, one extending to the ventrolateral margin of the anteroventral arm of the coracoid and the ventral face of the adductor profundus, and the other to the pelvis. The posterior shift of the anteroventral limit of the obliquus inferioris is undoubtedly a specialized condition.

Swimbladder and associated muscles

MATSUBARA (1943) examined the swimbladder and extrinsic muscle of Japanese scorpaenoids, classifying them into nine types based on the following characters: presence or absence of the swimbladder, its relation to the layer of connective tissue lying outside the peritoneum, shape of the swimbladder, and structure of the extrinsic. HALLACHER (1974) examined the swimbladder muscles in a total of 82 species of *Sebastes*, 23 other scorpaenid genera and nine other scorpaeniform families. He classified swimbladder muscles of *Sebastes* into two morphotypes, the first having the extrinsic attached firmly to the pectoral girdle, at a point between the origin on the occipital cranium and the insertion on the vertebrae, and the second having the extrinsic bypassing the pectoral girdle. YABE (1985) studied the swimbladder muscles of cottoids and other scorpaeniforms, including *Sebastes, Helicolenus, Sebastolobus, Setarches, Pterois, Apistus,* and *Hypodytes*, classifying them into four types based on the following characters: position of the extrinsic insertions, branching condition of the extrinsic, relationship between the extrinsic, and Baudelot's ligament, and presence or absence of the intrinsic. Nine derived characters are recognized here.

(41) Swimbladder absent: The significance of the presence or absence of the swimbladder was difficult to evaluate, owing to the degree of variability in scorpaenoids. Both conditions occur in all scorpaenoid families except pataecids and the monotypic gnathanacanthid. This shows that loss of the swimbladder may have occurred many times in the different phyletic lines. Nevertheless, the absence of a swimbladder is considered as a derived condition for phylogenetic consideration. Group 41 0 has a swimbladder; group 41-1 does not.

(42) Extrinsic lying ventrally to ribs: In group 42-0, the extrinsic lies dorsally to several anterior pleural ribs, but ventrally in group 42 1. Because the extrinsic is evidently transformed from the obliquus superioris, which lies above the pleural ribs, the condition of group 42-0 is considered primitive.

(43) Extrinsic insertions branched: In group 43-0, including most scorpaenoids, each insertion of the extrinsic on the swimbladder or vertebral parapophysis is simple; in group 43 1, the setarchid *Ectreposebastes*, each insertion is branched. The branched condition of group 43-1 is unquestionably derived.

(44) Extrinsic origin restricted to supracleithrum: In generalized percoids and group 44 0, including most scorpaenoids, the origin of the extrinsic includes the occipital face of the neurocranium; in group 44-1, the origin is restricted to the medial face of the supracleithrum.

(45) Extrinsic not connected with supracleithrum: In group 45-0, the extrinsic is connected with the supracleithrum, but not so in group 45-1. A relationship between extrinsic and Baudelot's ligament was not found. Because group 45-0 includes sebastids and scorpaenids which also lack the intrinsic, it is considered primitive.

(46) Extrinsic connected directly with supracleithrum: Most of group 45-0 taxa (group 46-0) had the extrinsic connected with the supracleithrum through Baudelot's ligament; in group 46-1, the extrinsic is connected with the supracleithrum directly, apparently being the derived condition.

(47) Intrinsic present: Group 47 0, including most scorpaenoids does not have the intrinsic; it is present as a derived character in group 47-1.

(48) Intrinsic separated from extrinsic: Among group 47 1, the apistid (group 48-1) has a well developed intrinsic occurring separately from the extrinsic. Undoubtedly this is a unique and specialized condition.

(49) Baudelot's ligament absent: Group 49-0, including most scorpaenoids, retains Baudelot's ligament, being a typical acanthopterygian character; it is absent in group 49-1.

Neurocranium

Many workers have examined the scorpaenoid neurocranium (Gill 1888, Eigenmann and Beeson 1893, 1894, Cramer 1895, Allis 1909, Starks 1926, de Beer 1937, Matsubara 1934, 1936, 1943, 1955, Eschmeyer and Collette 1966, Eschmeyer 1984, Yabe 1985). In particular, Matsubara's (1943) detailed descriptions of Japanese scorpaenoids included six characters of the neurocranium: 1) general configuration of the supraoccipital and its relationship with the anterior interneural spines (here termed dorsal proximal pterygiophores), 2) presence or absence of the posterior opening of the myodome, 3) articulation of the epiotic with other cranial elements, 4) presence or absence of the basisphenoid, 5) presence or absence of the basisphenoid ventral process, and 6) relationship of the ectethmoid (ethmoid) to the vomer (prevomer). Five derived characters are recognized here. Of Matsubara's characters (above) 1) is discussed under characters 88 to 93, 3) under character 54, 4) under character 52, and 6) under character 50.

(50) Lateral ethmoid separated from prevomer: In group 50-0, the lateral ethmoid meets the prevomer anteroventrally, with the ethmoid and parasphenoid being separate; in group 50 1, the ethmoid and prevomer are separate, with the ethmoid meeting the parasphenoid. The condition of group 50 1 is considered derived because this is thought to have occurred as a result of the prolongation of the ethmoid (Matsubara 1943).

(51) Prevomerine teeth absent: In group 51 0, a villiform prevomerine tooth band is present; it is absent in group 51-1, the loss apparently being derived.

(52) Basisphenoid absent: In generalized percoids and group 52 0, including most scorpaenoids, the basisphenoid is present; it is absent in group 52-1.

(53) Epiotics of both sides meeting: In generalized percoids and group 53 0, including most scorpaenoids, the epiotics of each side are separated by the articulation of the supraoccipital and exoccipital; in group 53-1, the epiotics meet.

(54) Intercalar separated from prootic; intercalar absent: In generalized percoids and group 54 0, including most scorpaenoids, the intercalar meets the prootic posteriorly; in group 54-1, the intercalar is comparatively small and is separated from the prootic by the articulation of the pterotic and exoccipital; group 54 - 2 has lost the intercalar. The posterior shift and reduction of the intercalar are thought to have occurred as a result of specialization of the neurocranium.

Nasal and circumorbital bones

Many ichthyologists have regarded the infraorbital stay as the most important and, in practice, only structure characterizing the Scorpaeniformes. Because of the phylogenetic significance of the infraorbitals, they have been considered by many workers including ALLIS (1909), STARKS (1926), GREGORY (1933), MATSUBARA (1934, 1936, 1943), ESCHMEYER and COLLETTE (1966), and ESCHMEYER (1969). MATSUBARA's (1943) analysis of the infraorbitals of Japanese scorpaenoids, included three structural characters: 1) number of suborbitals (= infraorbitals), 2) degree of development of the infraorbital stay, and 3) extent of the infraorbital sensory canal. Four derived characters are recognized here. Of MATSUBARA's characters (above) 1) is discussed under characters 56 and 57, 2) under character 55, and 3) under character 58.

(55) Infraorbital stay absent: In group 55 - 0, including most scorpaenoids, an infraorbital stay is typically formed; in group 55 1, an infraorbital stay is absent. Because group 55-0 includes all sebastids and scorpaenids, the absence of the stay is considered derived.

(56) Infraorbitals 4 and 5 reduced: In group 56-0, infraorbitals 4 and 5 are present; in group 56-1, one of these bones is absent; in group 56-2, both infraorbitals 4 and 5 are absent. The condition of group 56-0 is considered primitive because a reduction of bones in fishes is generally believed to indicate specialization.

(57) Dermosphenotic absent: Group 57-0 has a dermosphenotic; it is absent in group 57-1. For the reason given for group 56-0, the former condition is considered primitive.

(58) Infraorbital neurocranium sensory canal absent: In generalized percoids and group 58-0, a canal between infraorbital 3 and the temporal part of the neurocranium is present; it is absent in group 58-1.

Suspensorium

Allis (1909), Gregory (1933), and Matsubara (1934, 1936, 1940, 1943) examined the suspensorium of scorpaenoids, Matsubara (1943) noting three characters: 1) degree of development of the mesopterygoid (here termed entopterygoid), 2) diminution of the metapterygoid, and 3) diminution of the prepalatine process. Two derived characters are recognized here. Of Matsubara's characters (above) 1) and 2) are discussed under character 60.

(59) Palatine teeth absent: In group 59-0, palatine teeth are present; they are absent in group 59-1, an apparent specialization.

(60) Hyomandibular/metapterygoid space closed: In generalized percoids and group 60-0, including most scorpaenoids, a space is present between the hyomandibular and metapterygoid; in group 60-1, it is closed.

Hyoid arch

Only Matsubara (1943) considered the hyoid arches of Japanese scorpaenoids from a phylogenetic view point, discussing the number of branchiostegal rays. In addition to this character, the presence or absence of the basihyal is discussed here.

(61) Basihyal absent: Generalized percoids and group 61 - 0, including most scorpaenoids, have a basihyal; it is absent in group 61-1.

(62) Branchiostegal rays reduced in number: In group 62 - 0, including most scorpaenoids, the branchiostegal rays number seven, as in generalized percoids; group 62 1 is characterized by six branchiostegal rays; in group 62-2 by five.

Branchial arches

No comprehensive study of scorpaenoid branchial arches has been previously made. Seven derived characters are recognized here.

(63) Pharyngobranchial 1 absent: Generalized percoids and group 63-0, including most scorpaenoids, have pharyngobranchial 1; it is absent in group 63-1.

(64) Pharyngobranchials 2 and 3 fused; pharyngobranchials 2 and 3, and upper pharyngeal fused: In generalized percoids and group 64-0, including most scorpaenoids, pharyngobranchials 2 and 3, and the upper pharyngeal are separate; in group 64 - 1, pharyngobranchials 2 and 3 are fused; in group 64-2, pharyngobranchials 2 and 3, and the upper pharyngeal are fused.

(65) Pharyngobranchial 3 and upper pharyngeal fused: In generalized percoids and group 65 -0, including most scorpaenoids, pharyngobranchial 3 and the upper pharyngeal are separate; in group 65-1, they are fused. The fusion of pharyngobranchials 2 and 3, and the upper pharyngeal is noted as character 64-2.

(66) Pharyngobranchial 2 teeth absent: In generalized percoids and group 66-0, pharyngobranchial 2 is toothed; it is toothless in group 66-1.

(67) Epibranchial 3 teeth absent: In generalized percoids and group 67-0, epibranchial 3 is toothed; it is toothless in group 67-1.

(68) Interarcual cartilage absent: Generalized percoids and group 68-0, including most scorpaenoids, have an interarcual cartilage; it is lost in group 68-1.

(69) Interarcual cartilage ossified: In generalized percoids and group 69-0, including most of group 68-0, the interarcual cartilage is unossified; in group 69-1, it is ossified.

Vertebrae and associated bones

MATSUBARA (1940, 1943), HOTTA (1961), and TAKAHASHI (1962) examined the vertebrae and associated bones of scorpaenoids, MATSUBARA (1943) especially presenting detailed information on the structure and number of vertebrae of Japanese scorpaenids. However, previous studies have lacked any phylogenetic considerations of scorpaenoid vertebrae. Two derived characters are recognized here.

(70) More than 24 vertebrae: The number of vertebrae in fishes is often variable within a species and may change during early development due to temperature influences. However, each species has a given number of vertebrae within a certain range. In scorpaenoids a number of genera (group 70-0) usually have 24 vertebrae, the number usually associated with generalized percoids. Most of the other scorpaenoid genera (group 70-1) always have more than 24 vertebrae, none of those examined having less. Twenty-four vertebrae in scorpaenoids is considered to be the primitive condition, the number increasing with specialization. The tetrarogid *Richardsonichthys* and synanceiid *Synanceia* (group 70-R) usually have 24 vertebrae. This condition is believed to be a secondary reduction from a number greater than 24, because the most parsimonious cladogram of scorpaenoid relationships shows that such a step saves ten or 11 parallelisms.

(71) Pleural ribs absent: Generalized percoids and group 71-0, including most scorpaenoids, have pleural ribs; they are absent in group 71-1.

Caudal skeleton

Although MONOD (1967), YABE (1985), and FUJITA (1990) examined the caudal skeleton of some scorpaenoids, but to date there has been no comprehensive study on the scorpaenoid caudal skeleton, in spite of its phylogenetic importance. Ten derived characters are recognized here.

(72) Centrum and hemal spine of preural vertebra 2 fused: In generalized percoids and group 72-0, the centrum and hemal spine of preural vertebra 2 are autogenous; in group 72-1, they are fused.

(73) Centrum and hemal spine of preural vertebra 1 fused: In generalized percoids and group 73-0, including most scorpaenoids, the centrum and hemal spine of preural vertebra 1 are autogenous; in group 73-1, they are fused.

(74) Neural spine of preural vertebra 1 long: In generalized percoids and group 74-0, the neural spine of preural vertebra 1 is short; in group 74-1, it is long.

(75) Urostyle and uroneural fused: In generalized percoids and group 75-0, including most scorpaenoids, the urostyle and uroneural are autogenous; in group 75 1, they are fused.

(76) Urostyle and parhypural fused: In generalized percoids and group 76-0, including most scorpaenoids, the urostyle and parhypural are autogenous; in group 76 1, they are fused.

(77) Urostyle and hypural fused: In generalized percoids and group 77-0, the urostyle and hypural are autogenous; in group 77-1, they are fused.

(78) Epurals reduced in number: The epurals number is three in generalized percoids and group 78-0, two in group 78-1, and one in group 78-2.

(79) Parhypural and hypural fused: In generalized percoids and group 79 0, the parhypural and lowermost hypural are autogenous; in group 79-1, they are fused.

(80) Hypurals reduced in number: The hypural formula (defined in the description of the hypural) is 2+3 in generalized percoids and group 80-0, 1+3 in group 80-1, 1+2 in group 80-2, and 1+1 in group 80-3.

(81) Caudal fin rays unbranched: In generalized percoids and group 81-0, including most scorpaenoids, the principal caudal fin rays are branched; in group 81-1, they are simple.

Pectoral girdle

Starks (1930) and Matsubara (1943) studied the scorpaenoid pectoral girdle, the latter recognized five significant characters: 1) the form and mode of articulation of the posttemporal with the cranium, 2) relationship of the uppermost actinost (here termed radial) to the hypercoracoid (scapula), 3) form of the upper element of the postclavicle (postcleithrum), 4) width of the actinost, and 5) presence or absence of the postcoracoid process. Four derived characters are recognized here. Matsubara's character 2) is discussed under character 83.

(82) Postcleithrum absent: Generalized percoids and group 82-0 including most scorpaenoids, have both dorsal and ventral postcleithra; they are absent in group 82-1.

(83) Scapula and uppermost radial fused: In group 83 0, the scapula and uppermost radial are autogenous; in group 83-1, they are fused. The autogenous condition is

considered primitive because a similar state exists in generalized percoids. In the congiopodid *Congiopodus*, the scapula and uppermost radial are autogenous (83 - R). However, this condition is believed to be secondarily derived, because the most parsimonious cladogram of scorpaenoid relationships, shows that such a step saves four parallelisms.

(84) Space between coracoid and lowermost radial closed: In generalized percoids and group 84-0, including most scorpaenoids, the space between the coracoid and lowermost radial, accommodating the coracoradialis, is present; in group 84-1, it is closed.

(85) Pectoral fin rays unbranched: In generalized percoids and group 85-0, the middle rays of the pectoral fin are branched; in group 85-1, all pectoral fin rays are unbranched.

Pelvic girdle

The only detailed study of scorpaenoid pelvic girdles to date is that of MATSUBARA (1943), who described the pelvic girdles of Japanese scorpaenids in detail. Two derived characters are recognized here.

(86) Pelvic fin rays reduced in number: The pelvic fin rays number five in generalized percoids and group 86-0, including most scorpaenoids, four in group 86-1, three in group 86-2, two in group 86-3, and one in group 86-4.

(87) Pelvic fin rays unbranched: In generalized percoids and group 87 0, including most scorpaenoids, some pelvic fin rays are branched; in group 87 1, all pelvic fin rays are unbranched.

Dorsal and anal fin supports

MATSUBARA (1943) and YABE (1985) studied the dorsal and anal fin supports in scorpaenoids, the former describing the anterior dorsal pterygiophores and neural spines in his discussion of the supraoccipital, and the latter presenting the general arrangement and evolutionary trends shown by these elements in scorpaeniforms. However, to date the structural variations existing in these supports in scorpaenoids have not been sufficiently detailed. Eight derived characters are recognized here.

(88) Supraneural absent: Group 88-0 has one supraneural in interneural space 1; a supraneural is absent in group 88-1. Generalized percoids have two or three supraneurals in interneural space 1 or 2. Because the condition of group 88-0 is more easily transformed from that of generalized percoids, it is considered primitive.

(89) Neural spines 1 and 2 articulating anteriorly: In generalized percoids and group 89-0, the neural spines do not articulate with the anterior bony elements; in group 89-1, neural spine 1 articulates anteriorly with the posterodorsomedial face of the neurocranium; in group 89-2, neural spine 1 articulates anteriorly with the posterodorsomedial face of

the neurocranium, and neural spine 2 anteriorly with neural spine 1.

(90) Neural spines 1 and 2 short: In generalized percoids and group 90-0, including most scorpaenoids, neural spines 1 and 2 are normally developed compared with the posterior elements; in group 90-1, the former are short.

(91) Dorsal proximal pterygiophores 1 and 2 separate: In group 91-0, including most scorpaenoids, the dorsal fin anteriormost proximal pterygiophore supports dorsal spines 1 and 2; in group 91-1, each dorsal fin proximal pterygiophore supports a dorsal spine. The condition of group 91-1 is apparently unique in scorpaenoids and is considered the result of the loss of dorsal spine 1.

(92) Dorsal proximal pterygiophores shifted anteriorly, type-1: The anterior shift of the dorsal proximal pterygiophores in the character 92-1 to 92-7 series is believed to have occurred in a different phyletic line from the character 93-1 and 93-2 series, because of the differing in the articulation of the neural spine to the neurocranium and the separation of the anterior pterygiophores supporting dorsal spines 1 and 2. In group 92-0, proximal pterygiophores 1+2 and 3 are inserted in interneural space 3 or on the posterodorsomedial face of the neurocranium, proximal pterygiophore 4 and those following are inserted in the interneural spaces of the same number; in groups 92-1 to 92-7, the dorsal proximal pterygiophores have shifted anteriorly step by step, as explained in the description of the proximal pterygiophore. The condition of group 92-0 is considered primitive because it is thought to be the most easily transformed from that of generalized percoids.

(93) Dorsal proximal pterygiophores shifted anteriorly, type-2: Group 93-0 is identical to group 92-0; in the series of groups 93-1 and 93-2, the anterior dorsal proximal pterygiophores have shifted anteriorly step by step, as explained in the description of the proximal pterygiophore.

(94) Dorsal fin rays unbranched: In generalized percoids and group 94-0, the dorsal fin soft-rays are branched; in group 94-1, all dorsal fin rays are unbranched.

(95) Anal fin rays unbranched: In generalized percoids and group 95-0, the anal fin soft-rays are branched; in group 95-1, all anal fin rays are unbranched.

The conditions of 95 characters in the 55 scorpaenoid genera examined are summarized in tables 24 (muscles) and 25 (skeletons).

Table 24. Muscles character conditions in 55 scorpaenoid genera. Space indicates the most primitive condition; "—" indicates not applicable.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
Sebastidae																																																	
Sebastes			1																																													—
Sebastiscus			1																																													—
Hozukius			1																																													—
Helicolenus			1																																					1								—
Adelosebastes			1																																					1								—
Sebastolobus			1																																					1								—
Trachyscorpia			1																																					1								—
Plectrogenium			1														1																								1								—
Setarchidae																																																	
Setarches									2			1																																				—
Lioscorpius									2				1																							1					1	1			1	—		—
Ectreposebastes							·		2				1					1																		1					1	1	1				—
Neosebastidae																																																	
Neosebastes									2		1																														1		1		1	—		
Maxillicosta									2																					1		1				1		1						1	—		
Scorpaenidae																																																
Pontinus																																															—
Neomerinthe																																								1							—
Phenacoscorpius																																															—
Parascorpaena																																								1							
Scorpaena																																								1							—
Iracundus																																								1							—
Scopaenopsis																																								1	1						—
Scorpaenodes																																			1						1			1	—	1	
Hoplosebastes																																			1						1			1	—	1	
Pterois							1																												1						1			1	—	1	
Ebosia							1																							1					1					1	1			1	—	1	
Brachypterois							1										1													1					1					1	1			1	—	1	
Dendrochirus							1																							1					1					1	1			1	—	1	
Parapterois							1																							1					1					1	1			1	—	1	
Rhinopias																																			1		1			1	1						—
Taenianotus											2						1																		1		1			1	1		1				—
Apistidae																																																
Apistus	1			1		1	1		2	1				1		1				1	—								1						1					1			1	-	1	1
Tetrarogidae																																																
Notesthes	1			2		1	1										1				1									1		1							1		1	1					—
Centropogon	1			2		1	1										1				1									1		1							1		1	1					—
Gymnapistes	1			2		1	1										1				1									1		1							1		1						—
Neocentrogon	1			2		1	1														1									1		1							1		1						—
Ocosia	1			2		1	1														1									1		1							1		1	1					—
Paracentropogon	1			2		1	1										1				1									1	1	1							1		1						—
Hypodytes	1			2		1	1														1									1	1	1							1		1						—
Liocranium	1			2		1	1					1									1									1	1	1							1		1			1	-	1	—
Ablabys	1			2		1	1		1	2											1									1	1	1							1		1						—
Richardsonichthys	1			2		1	1		1	2	1										1									1	1	1							1		1	1					—
Synanceiidae																																																
Inimicus				1		1	1		1	2	1						1	1			1									1		1		1	1				1		1	1					—
Synanceia				1		3	1		1	2	1							1			1									1		1	1	1	1				1		1						—
Erosa				1		3	1		1	2	1							1			1									1		1	1	1	1	2			1		1	1					—
Choridactylus				1		1	1		1	2					1		1				1									1		1		1	1				1		1						
Minous				1		2	1		1	2					1		1				1											1		1	1	1				1		1						-
Congiopodidae																																																
Congiopodus		1		1	1	2	2	2	2	3		1			1	1	1	1			3													1	1	—		1	—	1			1		—	1
Alertichthys		1		1		2	1	1	2	2		1			1	1	1	2			2			1									1	1	—		1	—	2		1			1	—	1
Zanclorhynchus		1		1	1	3	2	1	2	2		1	1		1	1	1	2			2			1				1					1	1			1	—	2	1	1			1	—	1
Gnathanacanthidae																																																
Gnathanacanthus				1		2		1									1				1	—														1				1						—
Aploactinidae																																																
Aploactis	1			2		2	1	1	1	4	1		1			1		1		1								1	1	1	1			1	1			1		1	1				1	—	
Erisphex				1		2	1	1	1	4	1		1			1		1		1								1	1	1	1			1	1			1		1					1	—	
Sthenopus				1		1	1	1	1	4	1		1			1		1		1								1	1	1	1			1	1			1		1	1				1	—	
Pataecidae																																																
Aetapcus	1		1	3		2		1	1	2	1		1			1		1		1	1	1	1	1	1	—	1	1	1	1	1			1	1			1		1							
Pataecus	1		1	3		2		1	1	2	1		1			1		1		1	1	1	1	1	1	—	1	1	1	1	1			1	1			1		1							
Neopataecus	1		1	3		2		1	1	2	1		1			1		1		1	1	1	1	1	1	—	1	1	1	1	1			1	1			1		1						-	

Table 25. Osteological character conditions in 55 scorpaenoid genera. Space indicates the most primitive condition; "-" indicates not applicable.

	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
Sebastidae																																															
Sebastes																					1									2		1															
Sebastiscus																					1									2		1															
Hozukius																					1									2		1															
Helicolenus																					1									2		1															
Adelosebastes																					1									2		1															
Sebastolobus																					1									2																	
Trachyscorpia							1														1																										
Plectrogenium							1								1						1																										
Setarchidae																																														
Setarches							2	1	1																																					
Lioscorpius							2	1	1																																					
Ectreposebastes							2	1	1																																					
Neosebastidae																																														
Neosebastes							1														1																										
Maxillicosta							1			1						1					1																										
Scorpaenidae																																														
Pontinus							1		1							1														1						1										
Neomerinthe							1		1							1														1																
Phenacoscorpius							2		1							1				1										2																
Parascorpaena							1		1																					2		1														
Scorpaena							1		1																					2		1														
Iracundus							1	1	1	1																				2		1														
Scopaenopsis							1		1	1								1												2		1														
Scorpaenodes							1		1	1																				1																
Hoplosebastes							2		1	1																				1																
Pterois	1						2		1	1																				1					1										
Ebosia	1						2		1	1																				1																
Brachypterois	1						2		1	1																				1																
Dendrochirus	1						2		1	1					1															1															
Parapterois	1						2		1	1						1														1															
Rhinopias	1						1		1	1																				2		1														
Taenianotus	1	1					1		1	1																				2					1										
Apistidae																																														
Apistus							1	1													1									1	2			1	1										
Tetrarogidae																																														
Notesthes							1	1													1									1	2		1									1	2		
Centropogon							1	1													1									1	2		1									1	2		
Gymnapistes							1	1													1									1	2		1									1	2		
Neocentropogon							1	1								1					1									1	2		1									1	2		
Ocosia							1	1								1					1									1	2		1									1	2		
Paracentropogon							1	1								1	1				1									1	2		1			1						1	2		
Hypodytes							1	1								1	1				1									1	2		1			1						1	2		
Liocranium							1	1		1					1	1	1				1									1	2		1			1						1	2		
Ablabys							1	1								1	1				1									1	2		1									1	2		
Richardsonichthys							1	1								1	1	1			R									1	3		1									1	2		
Synanceiidae																																														
Inimicus							1	1		1	1			1		−	1			1	1		1		1	1		1	1	1	3		1									1	2	1		
Synanceia		1					1	1		1	1				1	1	1				R				1					1	3		1									1	2	1		
Erosa							1	1		1						1	1				1				1	1		1	1	3		1				1					1	2	1		
Choridactylus		1					1	1		1		1		2	−	−	1			1	1		1		1					2		1									1	2	1		
Minous							1	1		1	1			2			1			1	1		1		1			1	1	2	1		1		1						1	2	1		1	1
Congiopodidae																																														
Congiopodus	1	1		1	1		2	1		1	1	1	2				1				1			1	1		1	1	1	3			R		1		1	1	1		1		2		
Alertichthys	1	1	1	1	1		2	1		1			1	1			1				1		1		1	1		1	1	3	1		1		1			1	1		1	−	1	1	1
Zanclorhynchus	1		1	1	1		2	1		1			1	1			1				1				1			1	1	3	1		1		1			1	1	1		1	1	1	1
Gnathanacanthidae																																														
Gnathanacanthus		1					1	1		1	1	1			1	1	1				1		1	1	1		1	1	1	3	1		1	1	1			1	1	2			1	−	1	1
Aploactinidae																																														
Aploactis					1		1	1		1	1		1	2	−	−	1	1			1	1	1		1					1	2	1		1		1	2	1	1	2		2		1	1
Erisphex					1		1	1		1	1		1	2	−	−	1		1	1	1	1	1		1			1		1	3	1		1		1	2	1	1	2		3	−	1	1
Sthenopus	1				1		1	1		1	1	1	1	2			1		1	1	1	1	1		1					1	3	1		1		1	2	1	1	2		4		1	1
Pataecidae																																														
Aetapcus	1	1	1		2	1	1	1		1	1	1	1	2	−	−	1				1		1	1	1	1	1	1	2	1	3	1	1	1		1	3	1	1	2		5		1	1
Pataecus	1		1		2	1	1	1		1	1	1	1	2		−	1				1		1	1	1	1	1	1	2	1	3	1	1	1		1	4	1	1	2		6	−	1	1
Neopataecus	1		1		2	1	1	1		1	1	1	1	2			1				1		1	1	1	1	1	1	2	1	3	1	1	1		1	4	1	1	2		7	−	1	1

2. RELATIONSHIPS

Figures 34 to 36 show the most parsimonious cladogram of 55 scorpaenoid genera based on 95 characters. The cladogram was constructed by parsimony (minimum number of steps) by hand. Characters were equally weighted. Subsequent character derivations (two or more derived states) were regarded individually for parsimony arguments. Polarity reversals were not hypothesized unless four or more parallelisms were saved, viz. the number of vertebrae (character 70) in *Richardsonichthys* and *Synanceia*, being a secondary reduction, the autogenous scapula and uppermost radial (character 83) in *Congiopodus*, being a secondary separation, and the absence of the infraorbital stay in pataecids, being a secondary reduction. For family ranking, the criterion of equal ranking for sister-groups was not always employed because it would lead to an excessively high rank for taxa branching near the root, for example *Sebastes* and its relatives, and an excessively low rank for taxa which had branched many times from the root, for example, *Neopataecus* and its relatives. Current classification systems were considered in the determination of the family ranking. In this section, the character number is shown in parenthesis.

Position of the Scorpaenoidei among the Scorpaeniformes

The scorpaenoid genera examined here share two derived characters: presence of an infraorbital stay and a single supraneural. These characters are not unique in the scorpaenoids however, but one shared throughout the Scorpaeniformes and have been used in support of the monophyly of the order. In fact, a single character establishing the monophyly of the Scorpaenoidei has not yet to be found. Nevertheless, the Scorpaenoidei is considered a natural group, because the other scorpaeniforms have been shown to be derived from non-scorpaenoid ancestors.

Recently, however, the Scorpaeniformes have been provisionally divided into several suborders: the Scorpaenoidei, Hexagrammoidei, Platycephaloidei, Congiopodoidei, and Cottoidei (LAUDER and LIEM 1983), or the Scorpaenoidei, Platycephaloidei, Anoplopomatoidei, Hexagrammoidei, and Cottoidei (NELSON 1984).

MATSUBARA (1943) hypothesized that the dactylopterid, peristediid, and triglid lineages were branched initially, followed by the cottid, agonid, cyclopterid, and liparidid lineages. Finally, the "generalized scorpaenid", hexagrammid, and anoplopomatid lineages and "specialized scorpaenid", bembrid, platycephalid, and hoplichthyid lineages arose. If his hypothesis was correct, that the Scorpaenidae occupied the basal position of the Scorpaeniformes, from which several derivatives evolved, the former should be considered the paraphyletic group. He stated that the hexagrammids, anoplopomatids, and "generalized scorpaenids" were closely related because the hexagrammid, *Hexagrammos*

otakii, the anoplopomatid, *Erilepis zonifer*, and the "generalized scorpaenid", *Sebastes glaucus*, strikingly resembled each other in having an unarmed neurocranium and a very wide and roundish interorbital space. However, such resemblances are undoubtedly secondary as Quast (1965) proposed after comparisons of hexagrammids with other scorpaeniforms. Matsubara (1943) suggested that the cottid, agonid, cyclopterid, and liparidid lineage shared with *Setarches* a common ancestor because of two derived characters, the absence of the basisphenoid and intervention of the scapula and coracoid by radials 2 and 3. However, Eschmeyer and Collette (1966) recognized a basisphenoid in all four species of *Setarches*, *Lioscorpius*, and *Ectreposebastes*. In addition, setarchids and the other scorpaenoid families, except sebastids, share one derived character (character 56-1), the absence of one of infraorbitals 4 and 5, whereas Yabe (1985) found both infraorbitals 4 and 5 in some cottoids, being the most primitive condition for the latter. Hence, Matsubara's suggestion cannot be seriously entertained.

Matsubara (1943) also speculated that *Sebastolobus* was related to *Plectrogenium*, with bembrids, platycephalids, and hoplichthyids having arisen from an ancestor not very unlike *Plectrogenium*. Matsubara and Ochiai (1955) and Washington *et al.* (1984) supported such a speculation. However, the presence of two supraneurals in the bembrid, *Parabembras*, as well as in generalized percoids, compared with scorpaenoids which have one or no supraneural, suggests that the bembrid, platycephalid, and hoplichthyid lineage was established earlier than the Scorpaenoidei ancestor, the similarity between the former and *Sebastolobus* or *Plectrogenium* being the result of parallelisms or shared primitive characters.

Washington *et al.* (1984) proposed the Apistinae to be a sister group of the Triglidae and Peristediidae on the basis of the following characters: bilobed swimbladder with intrinsic muscle, elongate pectoral fin rays, one to three free lower pectoral fin rays, and characteristic structure of the head bones, especially the infraorbitals. Although some other authors included the Triglidae and Peristediidae in the Scorpaenoidei (Lauder and Liem 1983, Nelson 1984), generalized triglids lack the following derived characters shared by *Apistus* and other scorpaenoids: only one of infraorbitals 4 and 5 reduced (character 56 1), hypurals numbering 1+3 (80-1), dermosphenotic absent (57), parhypural and hypural fused (79), hypurals numbering 1+2 (80-2), and scapula and uppermost radial fused (83). Of these characters, (56 1) is shared by all scorpaenoids, except sebastids, (80-1) is shared by all scorpaenoids except sebastids, setarchids, and neosebastids, and (57), (79), (80 2), and (83) are shared by *Apistus*, tetrarogids, synanceiids, congiopodids, the gnathanacanthid, aploactinids, and pataecids. Therefore, the Triglidae and Peristediidae are believed to have evolved in a different phyletic line from that of *Apistus* or other scorpaenoids.

Relationships within the Scorpaenoidei

At branching point A, the Scorpaenoidei branches into A1 and A2.

Sebastidae new family (Fig. 35)

Branch A1 comprises eight genera, *Sebastes, Sebastiscus, Hozukius, Helicolenus, Adelosebastes, Sebastolobus, Trachyscorpia*, and *Plectrogenium*, which share two derived characters. A1 branches into B1 and B2. The genera of B1, *Sebastes, Sebastiscus, Hozukius, Helicolenus, Adelosebastes*, and *Sebastolobus*, share two derived characters. B1 branches

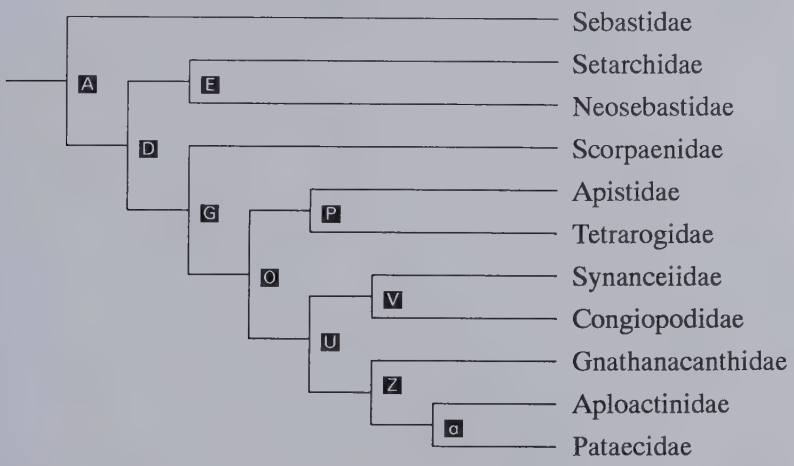


Fig. 34. Cladogram of the families of the suborder Scorpaenoidei. The relationships among the genera are shown in figures 35-36. Letters indicate the branching points.

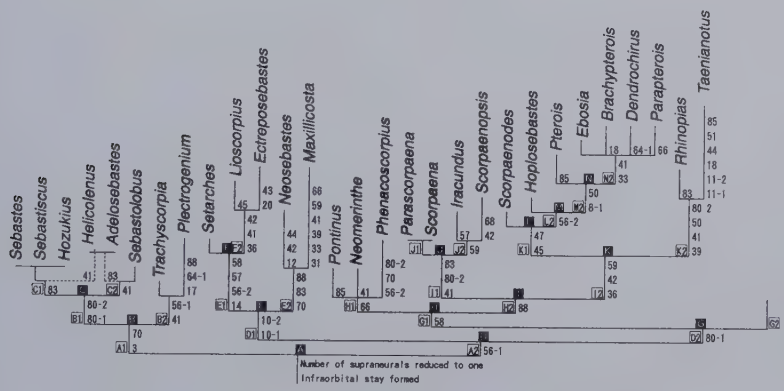


Fig. 35. Cladogram of genera in the Sebastidae (branch A1), Setarchidae (E1), Neosebastidae (E2), and Scorpaenidae (G1). Character numbers are arranged along each branch.

into C1 and *Sebastolobus*. The genera of C1, *Sebastes, Sebastiscus*, and *Hozukius*, share one derived character, (83). *Sebastolobus* has one derived character, (41). On the other hand, *Helicolenus* and *Adelosebastes*, included in B1, have both of (83) and (41), and it is impossible to determine whether these two genera were derived from C1 or from C2. The genera of B2, *Trachyscorpia* and *Plectrogenium*, share two derived characters, (41) and (56 - 1). *Trachyscorpia* has no further derived characters, whereas *Plectrogenium* has three.

Within the Sebastidae, two parallelisms are recognized: (41) in B2 and C2, and (41) in C2 and *Helicolenus-Adelosebastes*, or (83) in C1 and *Helicolenus-Adelosebastes*.

Because A1 branch forms a sister group of all other scorpaenoids, it must be treated as an independent taxon ranked as between suborder and genus. Because two parallelisms, which indicate close relationships between A1 genera, do not support a higher subdivision of the taxon, the new family Sebastidae was established for branch A1.

During his study on the intergeneric relationships in scorpaenoids, Matsubara (1943), from his examination of the infraorbitals, suspensorium, hyoid arch, neurocranium, vertebrae, pectoral girdle, pelvic girdle, and swimbladder and its associated muscles in Japanese genera, hypothesized that scorpaenoid specialization followed three directions, forming three generic groups: *Sebastes*-stem, *Scorpaena*-stem, and *Cocotropus*-stem, the last being a sub-branch of the *Scorpaena*-stem. He regarded the *Sebastes*-stem as the most primitive, proposing two subfamilies, the Sebastinae, including the primitive *Sebastes* and *Sebastiscus*, the more specialized *Helicolenus* and *Hozukius*, and the most specialized Neosebastinae. The present findings contradict the above hypothesis in the following respect: *Neosebastes* is not closely related to *Sebastes, Sebastiscus, Hozukius*, or *Helicolenus*, but instead to setarchids and the other scorpaenoids. Matsubara also considered the subfamily Sebastolobinae, containing only *Sebastolobus*, as a derivation from the *Scorpaena*-stem. He regarded as closely related to the more highly specialized *Plectrogenium*. These genera were each given monogeneric subfamily status. Eschmeyer (1969) considered *Trachyscorpia* as a member of the subfamily Sebastolobinae owing to the sharing by *Trachyscorpia* and *Sebastolobus* of a bilobed pectoral fin, fleshy lower pectoral fin rays and pelvic and anal fins, extra large anterior foramina, and median depression on the frontal. Eschmeyer, Abe, and Nakano (1979) also considered *Adelosebastes* as belonging to the Sebastolobinae because of the former's sharing the above characters with *Trachyscorpia* and *Sebastolobus*, and the absence of a swimbladder. The relationships shown herein are at odds with Matsubara's hypotheses in the following respects: *Sebastes, Sebastiscus, Hozukius, Helicolenus, Adelosebastes*, and *Sebastolobus* are closely related, forming the sister group of *Trachyscorpia* and *Plectrogenium*. *Adelosebastes* is possibly closely related to *Helicolenus*, because they share the same derived characters, in spite of

two parallelisms. Comparisons of the *Sebastes*-stem and Hexagrammoidei, and *Sebastolobus, Plectrogenium*, and the Platycephaloidei were discussed in the preceding section.

The genera of A2 share one derived character. A2 branches into D1 and D2. The genera of D1 share two derived characters. D1 branches into E1 and E2.

Setarchidae new family (Fig. 35)

Branch E1 comprises three genera, *Setarches, Lioscorpius*, and *Ectreposebastes*, which share four derived characters. E1 branches into *Setarches* and F2, the former having no further derived characters, whereas the F2 genera, *Lioscorpius* and *Ectreposebastes*, share three. *Lioscorpius* has one additional derived character, and *Ectreposebastes* has two, (20) and (43), both being unique in scorpaenoids.

Branch E1 is considered quite distinct from E2, because only a single parallelism (41) (in F2 and *Maxillicosta*) were recognized among the included genera. Although this does not support separate family ranking for branch D1, such status can be accorded for each of E1 and E2. Therefore, the new family Setarchidae was established for the branch E1.

MATSUBARA (1943) regarded the subfamily Setarchinae, including *Setarches* and *Macroscorpius* (synonym of *Lioscorpius*), as a special offshoot from his *Scorpaena*-stem. ESCHMEYER and COLLETTE's (1966) review of Setarchinae sensu MATSUBARA recognized three genera, *Setarches, Lioscorpius*, and *Ectreposebastes*. The relationships shown herein disagree with the hypotheses suggested by MATSUBARA because the Setarchidae is more closely related to the Neosebastidae than to his *Scorpaena*-stem.

Neosebastidae new family (Fig. 35)

Branch E2 comprises two genera, *Neosebastes* and *Maxillicosta*, which share four derived characters. The former has three additional derived characters, and the latter has six.

The new family Neosebastidae was established, because branch E2 is considered quite distinct from E1 as stated earlier.

MATSUBARA (1943) speculated that *Neosebastes* was a highly specialized offshoot from his *Sebastes*-stem, characterized by a T-shaped infraorbital 3 and chained infraorbitals 4 and 5 surrounding the posterior border of the eye. On the other hand, ESCHMEYER and POSS (1976) reviewed *Maxillicosta* and inferred its close relationship with *Neosebastes* on the basis of osteological characters. This study concurs with their conclusion because the two genera share three derived characters, (70), (83), and (88). However, the relationships shown herein are at odds with MATSUBARA's hypotheses in the following respect: *Neosebastes* and *Maxillicosta* are not closely related to sebastids, but instead form the sister group of setarchids. In fact, neosebastids plus setarchids form the sister group of all the remaining

scorpaenoids except sebastids.

The genera of D2 share one derived character, (80-1). D2 branches into G1 and G2.

Scorpaenidae (Fig. 35)

Branch G1 comprises 16 genera, *Pontinus, Neomerinthe, Phenacoscorpius, Parascorpaena, Scorpaena, Iracundus, Scorpaenopsis, Scorpaenodes, Hoplosebastes, Pterois, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus, Parapterois, Rhinopias*, and *Taenianotus*, which share one derived character. G1 branches into H1 and H2. The genera of H1 share one derived character. H1 branches into three genera *Pontinus, Neomerinthe*, and *Phenacoscorpius*. *Pontinus* has one additional derived character, *Neomerinthe* has one, and *Phenacoscorpius* has three. The genera of H2 share one derived character. H2 branches into I1 and I2. The genera of I1 share three derived characters. I1 branches into J1 and J2. J1 comprises *Parascorpaena* and *Scorpaena*, sharing no further derived characters. The genera of J2, *Iracundus* and *Scorpaenopsis*, share one derived character. *Iracundus* has one additional derived character. *Scorpaenopsis* has two. The genera of I2 share three derived characters. I2 branches into K1 and K2. The genera of K1 share two derived characters. K1 branches into *Scorpaenodes* and L2, the former having no further derived characters. The genera of L2 share one derived character. L2 branches into *Hoplosebastes* and M2, the former having no further derived characters. The genera of M2 share two derived characters. M2 branches into *Pterois* and N2, the former having an additional derived character. N2 branches into *Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus*, and *Parapterois*. *Ebosia* has no further derived characters and the remaining genera one each, respectively. The genera of K2 share four derived characters. K2 branches into *Rhinopias* and *Taenianotus*, the former having an additional derived character, and the latter six.

Within the Scorpaenidae, 12 parallelisms are recognized: (66) in H1 and *Parapterois*, (85) in *Pontinus, Pterois*, and *Taenianotus*, (41) in *Neomerinthe*, I1, and N2, (56 - 2) in *Phenacoscorpius* and L2, (80 2) in *Phenacoscorpius*, I1, and K2, (83) in I1 and *Rhinopias*, (59) in *Scorpaenopsis* and I2, (50) in M2 and K2, and (18) in *Brachypterois* and *Taenianotus*.

Matsubara (1943) proposed five subfamilies in his *Scorpaena*-stem: the Scorpaeninae, Pteroinae, Setarchinae, Sebastolobinae, and Plectrogeninae. The relationships shown herein are at odds with Matsubara's hypotheses in the following respects: *Scorpaenodes* and *Hoplosebastes* are closely related to *Pterois, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus*, and *Parapterois*, the latter corresponding to the subfamily Pteroinae sensu Matsubara. If the subfamily Pteroinae was limited so as to include *Pterois, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus*, and *Parapterois, Hoplosebastes* should be also given subfamilial status since it represents the sister group of M2 comprising the above five genera. This being so,

Scorpaenodes, K2, I1, and H1 should also be treated as subfamilies or higher taxa. Such a subdivision of the Scorpaenidae does not seem practical owing to the following reasons:

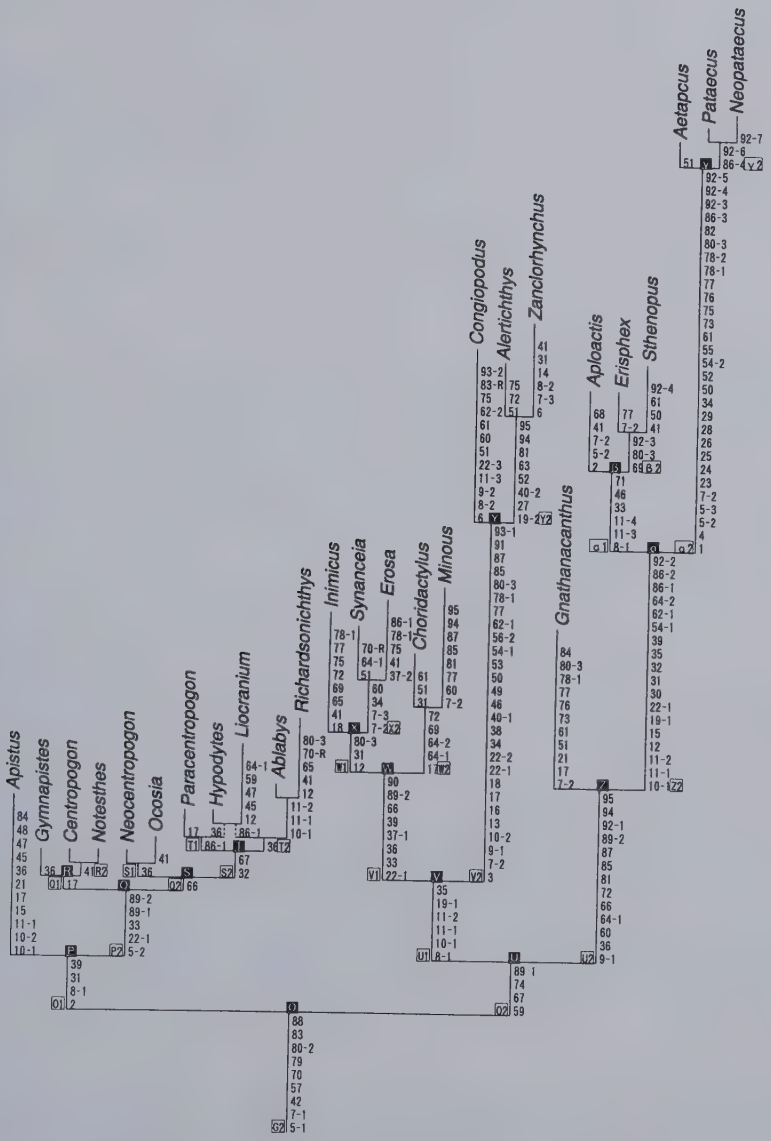


Fig. 36. Cladogram of genera in the Apistidae (*Apistus*), Tetrarogidae (branch P2), Synanceiidae (V1), Congiopodidae (V2), Gnathanacanthidae (*Gnathanacanthus*), Aploactinidae (α1), and Pataecidae (α2). Character numbers are arranged along each branch.

the possibility of future changes in the branching pattern within the Scorpaenidae still remains, since some branches are not firmly supported by uniquely derived characters. This is implied by the 12 parallelisms occurring among only 16 genera. In addition, a derived character unique to *Hoplosebastes* and *Scorpaenodes* was not found. Clearly, additional information is needed for the definition of lower taxa in the Scorpaenidae. The phylogenetic relationships of the following genera remain unrevealed: *Rhinopias*-related genera reviewed by Eschmeyer *et al.* (1973), *Idiastion*, considered a close relative of *Phenacoscorpius* by Eschmeyer (1965b), *Sebastapistes*, and *Thysanichthys*.

The genera of G2 share nine derived characters, of which (5-1),(7-1), and (79) are unique in scorpaenoids. G2 branches into O1 and O2.

The genera of O1 share four derived characters. O1 branches at P into the Apistidae and Tetrarogidae.

Apistidae new family (Fig. 36)

Apistus has 11 additional derived characters, of which (48) is unique in scorpaenoids.

Apistus forms the sister group of branch P2, which comprises ten closely related genera. The above 11 derived characters of *Apistus* and five derived characters shared by the P2 genera support the separation of *Apistus* from the latter. Therefore, the new family Apistidae was established.

Matsubara (1943) deduced that the *Cocotropus*-stem was a sub-branch of his *Scorpaena*-stem, owing to the well developed infraorbital 3 and reduction of infraorbitals 4 and 5, in the former, which he regarded as the most specialized branch of the three stems. He subdivided the *Cocotropus*-stem into three groups: *Apistus* (the most generalized); *Minous*, *Erosa*, and *Inimicus*; and *Neocentropogon*, *Hypodytes*, *Ocosia*, *Erisphex*, *Aploactis*, and *Cocotropus*. The relationships shown herein are at odds with Matsubara's hypotheses regarding *Apistus* in the following respects: the swimbladder of *Apistus* is specialized amongst scorpaenoids in having derived characters (36), (45), (47), and (48) as mentioned above. Furthermore, *Apistus* is a sister group of the Tetrarogidae, including *Neocentropogon*, *Hypodytes*, and *Ocosia*, that were regarded by Matsubara as members of the most specialized subdivision. A comparison of *Apistus*, triglids, and peristediids was given earlier.

Tetrarogidae (Fig. 36)

Branch P2 comprises ten genera, *Gymnapistes*, *Centropogon*, *Notesthes*, *Neocentropogon*, *Ocosia*, *Paracentropogon*, *Hypodytes*, *Liocranium*, *Ablabys*, and *Richardsonichthys*, which share five derived characters. P2 branches into Q1 and Q2. The genera of Q1 share one derived character. Q1 branches into *Gymnapistes* and R2. *Gymnapistes* has an additional

derived character. The genera of R2, *Centropogon* and *Notesthes*, share one derived character, but possess no further derived characters. The genera of Q2 have one derived character. Q2 branches into S1 and S2. The genera of S1, *Neocentropogon* and *Ocosia*, share one derived character, (36), with *Ocosia* having an additional derived character. The genera of S2 share two derived characters. S2 branches into T1 and T2. T1, including *Paracentropogon*, is characterized by one derived character, (86-1). T2, including *Ablabys* and *Richardsonichthys*, is characterized by one derived character, (36). On the other hand *Hypodytes* and *Liocranium* share both characters (36) and (86 1), making impossible the determination of their derivation, being either from T1 or T2. *Paracentropogon* has an additional derived character. *Hypodytes* has no further derived characters, whereas *Liocranium* has five. *Ablabys* and *Richardsonichthys* share three additional derived characters. *Ablabys* has no further derived characters, whereas *Richardsonichthys* has five.

Within the Tetrarogidae, seven parallelisms are recognized: (17) in Q1 and *Paracentropogon*, (36) in *Gymnapistes*, S1, and T2, (41) in R2, *Ocosia*, and *Richardsonichthys*, (12) in *Liocranium* and *Richardsonichthys*, (64-1) in *Liocranium* and *Richardsonichthys*, and either (86-1) in T1, and *Hypodytes-Liocranium* or (36) in *Hypodytes-Liocranium*.

MATSUBARA (1943) defined the family Congiopodidae as the third subdivision of his *Cocotropus*-stem, dividing it into two subfamilies, the Tetraroginae, including *Neocentropogon, Hypodytes*, and *Ocosia*, and the Aploactininae, including *Erisphex, Aploactis*, and *Cocotropus*. He regarded the Tetraroginae as being slightly less specialized than the Aploactininae. POSS and ESCHMEYER (1975) proposed the Tetraroginae, including *Amblyapistus* (synonym of *Ablabys*), *Hypodytes, Liocranium, Ocosia, Paracentropogon, Ptarmus, Snyderina, Tetraroge*, and several other genera of uncertain status. The relationships proposed here indicate that MATSUBARA's Tetraroginae (present Tetrarogidae) is not closely related to his Aploactininae (present Aploactinidae), but instead forms a sister group of *Apistus*. Furthermore, the definition of the Tetraroginae by POSS and ESCHMEYER is upheld, although familial status is given.

The genera of O2 share four derived characters. Of these (74) is unique in scorpaenoids. O2 branches into U1 and U2. The genera of U1 share six derived characters. U1 branches into V1 and V2.

Synanceiidae (Fig. 36)

Branch V1 comprises five genera, *Inimicus, Synanceia, Erosa, Choridactylus*, and *Minous*, which share eight derived characters. Of these (37-1) and (90) are unique in scorpaenoids. V1 branches into W1 and W2. The genera of W1, *Inimicus, Synanceia*, and *Erosa*, share three derived characters. W1 branches into *Inimicus* and X2, the former

having eight derived characters. The genera of X2, *Synanceia* and *Erosa*, share four derived characters. *Synanceia* has three additional derived characters. *Erosa* has five additional derived characters. Of these (37 - 2) is unique in scorpaenoids. The genera of W2, *Choridactylus* and *Minous*, share four derived characters. *Choridactylus* has three additional derived characters, whereas *Minous* has eight.

Within the Synanceiidae 11 parallelisms are recognized: (31) in W1 and *Choridactylus*, (41), (75), and (78-1) in *Inimicus* and *Erosa*, (69) and (72) in *Inimicus* and W2, (77) in *Inimicus* and *Minous*, (7-2) and (60) in X2 and *Minous*, (51) in *Synanceia* and *Choridactylus*, and (64-1) in *Synanceia* and W2.

Matsubara (1943) placed the family Synanceiidae as the second subdivision of his *Cocotropus*-stem, dividing it into two subfamilies, the Minoinae, including *Minous*, and the Synanceiinae, including *Inimicus* and *Synanceia*. He regarded the Minoinae as less specialized than the Synanceiinae. Eschmeyer and Rama-Rao's (1973) review of Matsubara's Synanceiinae recognized six genera, including *Synanceia* and *Erosa*. Eschmeyer, Hallacher, and Rama-Rao (1979) and Eschmeyer, Rama-Rao, and Hallacher (1979) later reviewed the Minoinae and Choridactylinae, respectively, including *Minous* in the former and *Choridactylus* and *Inimicus* in the latter. Eleven parallelisms amongst the above five genera indicate their close relationship. The most parsimonious cladogram suggests close relationships between *Synanceia* and *Erosa*, and between *Choridactylus* and *Minous*. The former concurs with Eschmeyer and Rama-Rao (1973), but the latter does not agree with Eschmeyer, Rama-Rao, and Hallacher (1979). The close relationships among the synanceiid genera do not support the subdivision of the family.

Congiopodidae (Fig. 36)

Branch V2 comprises three genera, *Congiopodus*, *Alertichthys*, and *Zanclorhynchus*, which share 27 derived characters. Of these characters (9-1), (13), (16), (22-2), (40 1), (49), (53), (91), and (93-1) are unique in scorpaenoids. V2 branches into *Congiopodus* and Y2. The former has 12 additional derived characters, of which (9-2), (22-3), and (93-2) are unique in scorpaenoids. The genera of Y2, *Alertichthys* and *Zanclorhynchus*, share eight derived characters, of which (27), (40 2), and (63) are unique in scorpaenoids, and have three and five additional derived characters.

Within Congiopodidae four parallelisms are recognized: (6) and (8-2) in *Congiopodus* and *Zanclorhynchus*, and (51) and (75) in *Congiopodus* and *Alertichthys*.

Matsubara (1943) recognized the Congiopodidae as a group comprising the present Tetrarogidae and Aploactinidae. However, most workers have considered the

Congiopodidae as a group inhabiting only in the Southern Hemisphere (SMITH 1958, QUAST 1965, GREENWOOD *et al.* 1966, HUREAU 1971, NELSON 1984). The present results support this.

The genera of U2 share 13 derived characters, of which (92-1) is unique in scorpaenoids.

U2 branches into the family Gnathanacanthidae and Z2.

Gnathanacanthidae (Fig. 36)

The monotypic gnathanacanthid genus *Gnathanacanthus* has 11 additional derived characters.

Although the Gnathanacanthidae has been recognized as a member of the Scorpaenoidei, being treated either as a family (SCOTT *et al.* 1974) or subfamily (of Pataecidae, comprising Pataecinae and Gnathanacanthinae) (NELSON 1984), no phylogenetic study of the family has been previously made. The relationships proposed here indicate that Gnathanacanthidae is a sister group of the Aploactinidae+Pataecidae (=Z2), defined by 13 derived characters. Gnathanacanthidae has further 11 derived characters, whereas Aploactinidae and Pataecidae share another 18, supporting the independent family status of Gnathanacanthidae.

The genera of Z2 share 18 derived characters, of which (30), (86 2), and (92 2) are unique in scorpaenoids.

Z2 branches into $\alpha 1$, corresponding to the family Aploactinidae, and $\alpha 2$, corresponding to the family Pataecidae.

Aploactinidae (Fig. 36)

Branch $\alpha 1$ comprises three genera, *Aploactis, Erisphex*, and *Sthenopus*, which share six derived characters, of which (11-4) is unique in scorpaenoids. $\alpha 1$ branches into *Aploactis* and $\beta 2$, the former having five additional derived characters. The genera of $\beta 2$, *Erisphex* and *Sthenopus*, share three derived characters, and have two and four additional derived characters.

Within the Aploactinidae two parallelisms are recognized: (7-2) in *Aploactis* and *Erisphex* and (41) in *Aploactis* and Sthenopus.

Although MATSUBARA (1943) regarded his Aploactininae as a more specialized sister group of his Tetraroginae, the relationships proposed here show that the former in fact forms a sister group of the Pataecidae.

Pataecidae (Fig. 36)

Branch $\alpha 2$ comprises thee genera, *Aetapcus, Pataecus*, and *Neopataecus*, which share 29 derived characters, of which (1), (4), (5-3), (23), (24), (25), (26), (28), (29), (55), (82), (86-3), and

(92-5) are unique in scorpaenoids. $\alpha 2$ branches into *Aetapcus* and $\gamma 2$, the former having one additional derived character. The genera of $\gamma 2$, *Pataecus* and *Neopataecus*, share two derived characters, both (86-4) and (92-6) being unique in scorpaenoids. *Pataecus* has no further derived characters, whereas *Neopataecus* has one additional derived character (92-7), unique in scorpaenoids.

The Pataecidae has been treated both as a family (Scott *et al.* 1974) and as a subfamily (of the Pataecidae with the Gnathanacanthinae) (Nelson 1984). However, no phylogenetic study has been previously made. This study demonstrates the close relationships of the Pataecidae with the Aploactinidae, rather than with the Gnathanacanthidae. Twenty-nine derived characters shared by the three genera support the family status of Pataecidae.

New classification of the Scorpaenoidei

Based on the above relationships, a new classification for the Scorpaenoidei is proposed below. Asterisked genera were not examined during the study.

Suborder Scorpaenoidei

Sebastidae new family

Sebastes, Sebastiscus, Hozukius, Helicolenus, Adelosebastes, Sebastolobus, Trachyscorpia, Plectrogenium

Setarchidae new family

Setarches, Lioscorpius, Ectreposebastes

Neosebastidae new family

Neosebastes, Maxillicosta

Scorpaenidae

Pontinus, Neomerinthe, Phenacoscorpius, Parascorpaena, Scorpaena, Iracundus, Scorpaenopsis, Scorpaenodes, Hoplosebastes, Pterois, Ebosia, Brachypterois, Dendrochirus, Parapterois, Rhinopias, Taenianotus, Idiastion, Sebastapistes*, Thysanichthys*, Hipposcorpaena*, Pogonoscorpius**

Apistidae new family

*Apistus, Cheroscorpaena**

Tetrarogidae

Gymnapistes, Centropogon, Notesthes, Neocentropogon, Ocosia, Paracentropogon, Hypodytes, Liocranium, Ablabys, Richardsonichthys, Coccotropsis, Cottapistus*, Glyptauchen*, Snyderina*, Tetraroge*, Vespicula**

Synanceiidae

Inimicus, Synanceia, Erosa, Choridactylus, Minous, Dampierosa, Pseudosynanceia*, Leptosynanceia*, Trachycephalus**

Congiopodidae,

*Congiopodus, Alertichthys, Zanclorhynchus, Perryena**

Gnathanacanthidae

Gnathanacanthus

Aploactinidae

*Aploactis, Erisphex, Sthenopus, Acanthosphex**, *Adventor**, *Aploactisoma**, *Bathyaploactis**, *Cocotropus**, *Eschmeyer**, *Kanekonia**, *Neoaploactis**, *Paraploactis**, *Peristrominous**, *Prosoproctus**, *Ptarmus**, *Xenaploactis**

Pataecidae

Aetapcus, Pataecus, Neopataecus

Caracanthidae

*Caracanthus**

Acknowledgments

I express my sincere gratitude to Prof. Kunio AMAOKA, Laboratory of Marine Zoology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate (HUMZ) for his guidance during the present study and critical reading of the manuscript. I am grateful to Prof.Takashi MINODA and Assoc. Prof. Kazuhiro NAKAYA, Hokkaido University, and Dr. Graham S. HARDY, National Museum of New Zealand, Wellington (NMNZ), for their critical reading of the manuscript.

I am deeply obliged to Dr. William N. ESCHMEYER, California Academy of Sciences, San Francisco (CAS), and Dr. Stuart G. POSS, Gulf Coast Research Laboratory and Museum, Ocean Springs, for their helpful advice and loan of materials. I am indebted to them and the following for permission to dissect their specimens: Dr. John R. PAXTON, Australian Museum, Sydney (AMS), Dr. John E. RANDALL and Mr. Arnold Y. SUZUMOTO, Bernice P. Bishop Museum, Honolulu (BPBM), Profs. Osamu OKAMURA and Yoshihiko MACHIDA, Laboratory of Biology, Kochi University, Kochi (BSKU), Dr. Tomio IWAMOTO, Mr. David CATANIA, and staff (CAS), honorary Prof. Tamotsu IWAI, Assoc. Profs. Izumi NAKAMURA and Tetsuji NAKABO, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto (FAKU), Drs. Hiroshi HATANAKA and Kazuya NAGASAWA, Far Seas National Fisheries Research Institute, Shimizu (FSFL), Mr. Hiroshi MISAKI, Kushimoto Marine Aquarium, Kushimoto, Wakayama (KUSHIMOTO), Drs. Jeffrey A. SEIGEL and Camm SWIFT, Los Angeles County Museum Natural History, Los Angeles (LACM), Drs. Teruya UENO and Keiichi MATSUURA, National Scienc Museum, Tokyo (NSMT), Mr. C. J. M. GLOVER, South Australian Museum, Adelaide, (SAMA), late Dr. Robert H. GIBBS, Jr., Drs. Bruce

Collette, Susan L. Jewett, and staff, United States National Museum of Natural History, Washington, D.C. (USNM), Drs. Yoshiaki Tominaga, Kazuo Sakamoto, and Mr. Masahiro Aizawa, University Museum, University of Tokyo, Tokyo (ZUMT), Mr. Andrew Stewart (NMNZ). The following extended courtesies to me during specimen collection: Messrs. Koji Abe, Jun Nakata, and Keiji Maeda, Hokkaido Prefectural Fisheries Experimental Stations, Hokkaido; Mr. Shojiro Fukui, Nachikatsuura, Wakayama; Prof. Hitoshi Ida, Kitazato University, Sanriku, Iwate; Dr. Kenji Mochizuki, Chiba Prefectural Natural History Museum, Chiba; Dr. Hin-Kiu Mok, National Sun Yat-Sen University, Kaohsiung; Mr. Tokuya Okuda and crews of Daikichi-maru no. 37, Shiogama; Dr. Kiyoshi Wakabayashi, Far Seas National Fisheries Research Institute, Shimizu; Lecturer Prof. Tetsuo Yoshino, Ryukyu University, Nishihara, Okinawa. I am especially appreciative to the respective staff of Nansei National Fisheries Research Institute, Kochi: Mr. Shinji Kudo, (presently Sogokagaku Co. Ltd., Osaka), Dr. Sunao Kosaka, Messrs. Tsutomu Koto, Fujio Hanaoka, Masahiro Toriyama, Yoshinobu Konishi (Presently Seikai National Fisheries Research Institute, Nagasaki), Mrs. Sumiko Nakazawa, Drs. Yuichi Hirota, Hiroshi Horikawa, and Mr. Haruyuki Morimoto. I offer my special thanks to the following for their encouragement and critical ichthyological discussions while at Hokkaido University: Dr. Yukio Sawada, Seibu College of Medical Technology, Tokorozawa; Dr. Tsutomu Kanayama, Sogokagaku Co. Ltd., Osaka; Lecturer Prof. Mamoru Yabe and graduate students (HUMZ), Dr. Kaoru Kido, Oma Town Office, Oma, Aomori; Dr. Shigeru Shirai, Seikai National Fisheries Research Institute, Nagasaki; Mr. Toru Miki, Himeji Municipal Aquarium, Himeji; and Dr. Kiyonori Nishida, Osaka Water Front Development Co. Ltd., Osaka.

References

ADAMICKA, V.P., 1972: Funkitiosanatomische Untersuchungen am Kopf von Akanthopterygien (Pisces, Teleostei): *Sarada sarada, Pterois volitans, Chrysophrys aurata*. Teil II: *Pterois volitans*. *Zool. Jahrb. Anat.*, **89**, 422-451.

ALLIS, E. P., 1909: The cranial anatomy of the mail-cheeked fishes. *Zoologica*, **22**, 1-219, pls. 1-5.

BARSUKOV, V. V., 1964: Key to the fishes of the family Scorpaenidae. *Trudy vses. nauchno-issled. Inst. morsk. ryb. Khoz. Okeanogr.*, **53**, 233-266. (In Russian)

BARSUKOV, V. V., 1968: The systematic relationship of redfishes of the genus *Sebastes* of the northwest Atlantic Ocean. *Dokl. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol.*, **183**(2), 734-737. (In Russian)

BARSUKOV, V. V., 1970: Species composition of genus *Sebastes* in the North Pacific and description of a new species. *Dokl. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol.*, **195**(4), 994-997. (In Russian)

BARSUKOV, V. V., 1972a: A systematic analysis of the group *Sebastes wakiai-Sebastes paradoxus-Sebastes steindachneri*. Communication 1 (Containing the description of a new species). *Vopr. Ikhtiol.*, **12**(4), 629-639. (In Russian)

BARSUKOV, V. V., 1972b: Systematics of the Atlantic redfishes. *Trudy polyar. nauchno-issled. proekt. Inst. morsk. ryb. Khoz. Okeanogr.*, **28**, 128-142. (In Russian)

BARSUKOV, V. V., 1973a: The species composition of the genus *Helicolenus* (Sebastinae, Scorpaenidae, Pisces) and a description of a new species. *Vopr. Ikhtiol.*, **13**(2), 161-166. (In Russian)

BARSUKOV, V. V., 1973b: A systematic analysis of the group *Sebastes wakiyai-S. paradoxus-S. steindachneri*. Communication 2 (Containing a redescription of *S. wakiyai*). *Vopr. Ikhtiol.*, **13** (6), 990-1000. (In Russian)

BARSUKOV, V. V., 1981: A brief review of the subfamily Sebastinae. *Vopr. Ikhtiol.*, **21**(1), 3-27. (In Russian)

BERG, L. S., 1940: Classification of fishes, both recent and fossil. *Tr. Inst. Zool. Akad. Nauk. SSSR*, **5**(2), 87-517. (In Russian)

CHEN, L-C., 1971: Systematics, variation, distribution, and biology of rockfishes of the subgenus *Sebastomus* (Pisces, Scorpaenidae, *Sebastes*). *Bull. Scripps Inst. Ocean.*, **18**, 1-115.

CHEN, L-C., 1981: Scorpaenoid fishes of Taiwan. *Quart. Journ. Taiwan Museum*, **34**(1,2), 1-60.

CRAMER, F., 1895: On the cranial characters of the genus *Sebastodes* (Rock-fish). *Proc. Calif. Acad. Sci., 2nd Ser.*, **5**, 573-610, pls. 57-70.

DE BEER, G. R., 1937: The development of the vertebrate skull. Oxford Univ. Press, London, xlvi + 546 pp., 143 pls.

DIETZ, P. A., 1914: Beitrage zur Kenntnis der Kiefer und Kiemenbogen-muskulatur der Teleostier. *Mitt. Statzione Zoologica Neapel*, **22**(4), 99-162.

EIGENMANN, C. H. and C. H. BEESON, 1893: Preliminary note on the relationship of the species usually united under the generic name *Sebastodes*. *Am. Nat.*, **27**, 668-671.

EIGENMANN, C. H. and C. H. BEESON, 1894: A revision of the fishes of the subfamily Sebastinae of the Pacific coast of America. *Proc. U.S. Nat. Mus.*, **17**, 375-407.

ESCHMEYER, W. N., 1965a: Western Atlantic scorpionfishes of the genus *Scorpaena* including four new species. *Bull. Mar. Sci. Gulf Caribb.*, **15**(1), 84-164.

ESCHMEYER, W. N., 1965b: There new scorpionfishes of the genera *Pontinus, Phenacoscorpius* and *Idiastion* from the western Atlantic Ocean. *Bull. Mar. Sci. Gulf Caribb.*, **15**(3), 521-534.

ESCHMEYER, W. N., 1969: A systematic review of the scorpionfishes of the Atlantic Ocean (Pisces: Scorpaenidae). *Occ. Pap. Calif. Acad. Sci.*, (79), 1-143, pls. 1-11.

ESCHMEYER, W. N., 1972: A new species of the scorpionfish genus *Helicolenus* from the North Pacific Ocean. *Proc. Calif. Acad. Sci., 4th Ser.*, **39**(4), 47-53.

ESCHMEYER, W. N., 1983: A new species of the fish genus *Pontinus* (Scorpaeniformes: Scorpaenidae)

from off Natal, South Africa. *Spec. Publ. J.L.B. Smith Inst. Ichthyol.*, (28), 1-4.

Eschmeyer, W. N., T. Abe, and S. Nakano, 1979: *Adelosebastes latens*, a new genus and species of scorpionfish from the North Pacific Ocean (Pisces, Scorpaenidae). *Uo*, (30), 77-84, pl. 1.

Eschmeyer, W. N. and B. Collette, 1966: The scorpionfish subfamily Setarchinae including the genus *Ectreposebastes*. *Bull. Mar. Sci.*, **16**(2), 349-375.

Eschmeyer, W. N., L. E. Hallacher, and K. V. Rama-Rao, 1979: The scorpionfish genus *Minous* (Scorpaenidae, Minoinae) including a new species from the Indian Ocean. *Proc. Calif. Acad. Sci., 4th Ser.*, **41**(20), 453-473.

Eschmeyer, W. N., Y. Hirosaki, and T. Abe, 1973: Two new species of the scorpionfish genus *Rhinopias*, with comments on related genera and species. *Proc. Calif. Acad. Sci., 4th Ser.*, **39** (16), 285-310.

Eschmeyer, W. N. and J. C. Hureau, 1971: *Sebastes mouchezi*, a senior synonym of *Helicolenus tristanensis* with comments on *Sebastes capensis* and zoogeographical consideration. *Copeia*, **1971**(3), 576-579.

Eschmeyer, W. N. and S. G. Poss, 1976: Review of the scorpionfish genus *Maxillicosta* (Pisces: Scorpaenidae), with a description of three new species the Australian-New Zealand region. *Bull. Mar. Sci.*, **26**(4), 433-449.

Eschmeyer, W. N. and K. V. Rama-Rao, 1973: Two new stonefishes (Pisces, Scorpaenidae) from the Indo-West Pacific, with a synopsis of the subfamily Synanceiinae. *Proc. Calif. Acad. Sci., 4th Ser.*, **39**(18), 337-382.

Eschmeyer, W. N. and K. V. Rama-Rao, 1977: A new scorpionfish, *Ebosia falcata* (Scorpaenidae, Pteroinae), from the western Indian Ocean, with comments on the genus. *Matsya*, **3**, 64-71.

Eschmeyer, W. N., K. V. Rama-Rao, and L. E. Hallacher, 1979: Fishes of the scorpionfish subfamily Choridactylinae from the western Pacific and the Indian Ocean. *Proc. Calif. Acad. Sci., 4th Ser.*, **41**(21), 475-500.

Fujita, K., 1990: The caudal skeleton of teleostean fishes. Tokai Univ. Press, Tokyo, viii+897 pp. (In Japanese)

Gill, T., 1888: On the classification of the mail-cheeked fishes. *Proc. U.S. Nat. Mus.*, **11**, 567-592.

Gosline, W. A., 1966: The limits of the fish family Serranidae, with notes on other lower percoids. *Proc. Calif. Acad. Sci., 4th Ser.*, **33**(6), 91-112.

Gosline, W. A., 1971: Functional morphology and classification of fishes. Univ. Press Hawaii, Honolulu, ix+208 pp.

Greenwood, P. H., 1971: Hyoid and ventral gill arch musculature in osteoglossomorph fishes. *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool.*, **22**(1), 1-55.

Greenwood, P. H., 1976: A revision of the family Centropomidae (Pisces, Perciformes). *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool.*, **29**(1), 1-81.

Greenwood, P. H. and G. V. Lauder, 1981: The protractor pectoralis muscle and the classification of the teleost fishes. *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool.*, **41**(4), 213-234.

Greenwood, P. H., D. E. Rosen, S. H. Weitzman, and G. S. Myers, 1966: Phyletic studies of teleostean fishes, wish a provisional classification of living forms. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, **131**(4), 339-456, pls. 21-23

Gregory, W. K., 1933: Fish skull: A study of the evolution of natural mechanisms. *Trans. Amer. Philos. Soc.*, **23**(2), i-vii+75-481.

Gutberlet, J. E. 1915: On the osteology of some of the Loricati. *Ill. Biol. Monogr.*, 2(2), 1-40,

Hallacher, L. E., 1974: The comparative morphology of extrinsic gasbladder musculature in the scorpionfish genus *Sebastes* (Pisces: Scorpaenidae). *Proc. Calif. Acad. Sci., 4th Ser.*, **40**(3), 59-86.

Hennig, W., 1966: Phylogenetic systematics. Univ. Illinois Press, Urbana, 263 pp.

Hotta, H., 1961: Comparative study of the axial skeleton of Japanese Teleostei. Research Council Secretariat, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tokyo, 155+10 pp., 70 pls. (In

Japanese)

HOWES, G. J., 1976: The cranial musculature and taxonomy of characoid fishes of the tribes Cynodontini and Characini. *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool.*, **29**(4), 201-248.

HOWES, G. J., 1980: The anatomy, phylogeny and classification of bariliine cyprinid fishes. *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool.*, **37**(3), 129-198.

HUREAU, J. C., 1971: Notes sur la famille des Congiopodidae (Téléostéens, Perciformes redécouverte de *Zanclorhynchus spinifer* GÜNTHER, 1880, aux îles Kerquelen et réhabilitation de *Congiopodus keineri* (SAUVAGE, 1878). *Bull. mus. natn. hist. natur. Série 2*, **42**(5), 1019-1026.

ISHIDA, M. and K. AMAOKA, 1986: *Sebastiscus triacanthus* FOWLER, a junior synonym of *Hozukius emblemarius* (JORDAN et STARKS). *Japan. J. Ichthyol.*, **33**(3), 323-325.

ISHIDA, M. and K. AMAOKA, 1989: *Sebastes* (*Acutomentum*) *paucispinosus* MATSUBARA, a junior synonym of *Sebastes alutus* (GILBERT). *Japan. J. Ichthyol.*, **36**(1), 129-134.

ISHIDA, M. and K. AMAOKA, 1992: A new species of the fish genus *Idiastion* (Pisces: Scorpaenidae) from the Kyushu-Palau Ridge, western Pacific. *Japan. J. Ichthyol.*, **38**(4), 357-360.

JOHNSON, G. D., 1980: The limits and relationships of the Lutjanidae and associated families. *Bull. Scrripps Inst. Ocean.*, **24**, 1-114.

JOHNSON, G. D., 1984: Percoidei: Development and relationships. In "Ontogeny and systematics of fishes based on an international symposium dedicated to the memory of Elbert Halvor AHLSTROM" (ed. by H. G. MOSER, W. J. RICHARDS, D. M. COHEN, M. P. FAHAY, A. W. KENDALL, Jr., and S. L. RICHARDSON), American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Spec. Publ., (1), Lawrence, 464-498.

KANAYAMA, T. and K. AMAOKA, 1981: First record of the scorpaenid fish *Brachypterois serrulatus* from Japan, with a key to Japanese genera of the Pteroinae. *Japan. J. Ichthyol.*, **28**(2), 181-183.

KATAYAMA, M., 1959: Studies on the serranid fishes of Japan (1). *Bull. Fac. Educ. Yamaguchi Univ.*, 8, Pt. 2, 103-180.

KAUFMAN, L. S. and K. F. LIEM, 1982: Fishes of the suborder Labroidei (Pisces: Perciformes): phylogeny, ecology, and evolutionary significance. *Breviora*, (472), 1-19.

LAUDER, G. V. and K. F. LIEM, 1983: The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes. *Bull. Mus. Comp. Zool.*, **150**(3), 95-197.

LEVITON, A. E., R. H. GIBBS, Jr., E. HEAL, and C. E. DAWSON, 1985: Standards in herpetology and ichthyology: Part I. Standard symbolic codes for institutional recource collections in herpetology and ichthyology. *Copeia*, **1985**(3), 802-832.

LIEM, K. F., 1970: Comparative functional anatomy of the Nandidae (Pisces: Teleostei). *Fieldiana. Zool.*, (56), 1-166.

LIEM, K. F., 1978: Modulatory multiplicity in the functional repertoire of the feeding mechanism in cichlid fishes. *J. Morphol.*, **158**(3), 323-360.

LIEM, K. F., 1981: A phyletic study of the Lake Tanganyika cichlid genera *Asprotilapia, Ectodus, Lestradea, Cunningtonia, Ophthalmochromis*, and *Ophthalmotilapia*. *Bull. Mus. Comp. Zool.*, **149**(3), 191-214.

LIEM, K. F. and P. H. GREENWOOD, 1981: A functional approach to the phylogeny of the pharyngognath teleost. *Amer. Zool.*, **21**(1), 83-101.

MATSUBARA, K., 1934: Studies on the scorpaenoid fishes of Japan. 1. Descriptions of one new genus and five new species. *J. Imp. Fish. Inst., Tokyo*, **30**(3), 199-210.

MATSUBARA, K., 1936: Studies on the scorpaenoid fishes of Japan. III. On the external and internal characters of *Sebastichthys longispinus* MIHI and *Sebastichthys brevispinis*, nom. nov., compared. *J. Imp. Fish. Inst., Tokyo*, **31**(2), 79-96.

MATSUBARA, K., 1940: Studies on the scorpaenoid fishes of Japan. IV. On a new classification of two subfamilies, Sebastinae and Scorpaeninae, based on the osteological characteristics of suborbital ring (Preliminary report). *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **8**(6), 373-378.

MATSUBARA, K., 1943: Studies on the scorpaenoid fishes of Japan. Anatomy, phylogeny and

taxonomy, I and II. *Trans. Sigenkagaku Kenkyusyo*, (1,2), 1-486, pls. 1-4.

Matsubara, K., 1955: Fish Morphology and Hierarchy. Ishizaki Shoten, Tokyo, vi v +1605+viii pp., 135 pls. (In Japanese)

Matsubara, K and A. Ochiai, 1955: A revision of the Japanese fishes of the family Platycephalidae (the flatheads). *Mem. Coll. Agri. Kyoto Univ.*, (68), 1-109.

Monod, T., 1967: Le complex urophore des poissons téléostéens. *Mem. Inst. Fond. Afr. Noire*, (81), 1-705.

Moreland, J., 1960: A new genus and species of congiopodid fish from southern New Zealand. *Rec. Dominion Mus.*, **3**, Pt. 3, 241-246.

Nelson, J. S., 1976: Fishes of the World. Wiley-Interscience, New York, x iii +416 pp.

Nelson. J. S., 1984: Fishes of the World, Second edition. Wiley-Interscience, New York, xv +523 pp.

Patterson, C., 1975: The braincase of pholidophorid and leptolepid fishes, with a review of the actinopterygian braincase. *Phil. Trans. R. Soc. London, Ser. B, Biol. Sci.*, **289**(899), 275-579.

Poss, S. G., 1982: A new aploactinid fish of the genus *Kanekonia* from Indonesia and redescription of *K. florida. Japan. J. Ichthyol.*, **28**(4), 375-380.

Poss, S. G. and W. N. Eschmeyer, 1975: The Indo-West Pacific scorpionfish genus *Ocosia* Jordan and Starks (Scorpaenidae, Tetraroginae), with description of three new species. *Matsya*, **1**, 1-18.

Poss, S. G. and W. N. Eschmeyer, 1978: Two new Australian velvetfishes, genus *Paraploactis* (Scorpaeniformes: Aploactinidae), with a revision of the genus and comments on the genera and species of the Aploactinidae. *Proc. Calif. Acad. Sci., 4th Ser.*, **41**(18), 401-426.

Poss, S. G. and W. N. Eschmeyer, 1979: *Prosoproctus pataecus*, a new genus and species of velvetfish from the South China Sea (Aploactinidae: Scorpaeniformes). *Japan. J. Ichthyol.*, **26**(1), 11-14.

Poss, S. G. and W. N. Eschmeyer, 1980: *Xenaploactis*, a new genus for *Prosopodasys asperrimus* Günther (Pisces: Aploactinidae), with descriptions of two new species. *Proc. Calif. Acad. Sci., 4th Ser.*, **42**(8), 287-293.

Poss, S. G. and V. G. Springer 1983: *Eschmeyer nexus*, a new genus and species of scorpaenid fish from Fiji. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, **96**(2), 309-316.

Quast, J. C., 1965: Osteological characteristics and affinities of the hexagrammid fishes, with a synopsis. *Proc. Calif. Acad. Sci., 4th Ser.*, **31**(21), 563-600.

Regan, C. T., 1913: The osteology and classification of the teleostean fishes of the order Scleroparei. *Ann. Mag. Nat. Hist., Ser. 8*, **8**(11), 169-184.

Rybachuk, V. K., 1976: Features of the structure of the skeleton and caudal fin muscles in *Sebastes nebulosus* Ayres and *Sebastes jordani* (Gilbert) (Sebastinae, Scorpaenidae). *Vopr. Ikhtiol.*, **16** (3), 502-509. (In Russian)

Rybachuk, V. K., 1979: Skeleton and dorsal fin muscles in *Sebastes jordani* (Gilbert) and *Sebastes nebulosus* Ayres (Scorpaenidae). *Vopr. Ikhtiol.*, **19**(4), 680-690. (In Russian)

Scott, T. D., C. J. M. Glover, and R. V. Southcott, 1974: The marine and freshwater fishes of South Australia, Second edition. A. B. James, Gov. Printer, South Australia, 392 pp.

Smith, J. L. B., 1958: Fishes of the families Tetrarogidae, Caracanthidae, and Synanceiidae, from the western Indian Ocean, with further notes on scorpaenid fishes. *Ichthyological Bulletin, Rhodes University*, (12), 167-181.

Starks, E. C., 1926: Bones of the ethmoid region of the fish skull. *Stanford Univ. Publ., Univ. Ser., Biol. Sci.*, **4**(3), 139-338.

Starks, E. C., 1930: The primary shoulder girdle of the bony fishes. *Stanford Univ. Publ., Univ. Ser., Biol. Sci.*, **6**(2), 149 239.

Takahashi, Y., 1962: Study for the identification of species based on the vertebral column of Teleostei in the Inland Sea and its adjacent waters. *Bull. Naikai Reg. Fish. Res. Lab.*, (16), 1-75, pls. 1-122. (In Japanese)

WASHINGTON, B. B., W. N. ESCHMEYER, and K. M. HOWE, 1984: Scorpaeniformes: Relationships. In "Ontogeny and systematics of fishes based on an international symposium dedicated to the memory of Elbert Halvor AHLSTROM" (ed. by H. G. MOSER, W. J. RICHARDS, D. M. COHEN, M. P. FAHAY, A. W. KENDALL, Jr., and S. L. RICHARDSON), American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Spec. Publ., (1), Lawrence, 438-447.

WATROUS, L. E. and Q. D. WHEELER, 1981: The out-group comparison method of character analysis. *Syst. Zool.*, **30**(1), 1-11.

WEITZMANN, S. H., 1962: The osteology of *Brycon meeki*, a generalized fish, with an osteological definition of the family. *Stanford Ichthyol. Bull.*, **8**(1), 3-77.

WILEY, E. O, 1981: Phylogenetics. Wiley-Interscience Publication, New York, xv +439 pp.

WINTERBOTTOM, R., 1974a: A descriptive synonymy of the striated muscles of the Teleostei. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philad.*, **125**(12), 225-317.

WINTERBOTTOM, R., 1974b: The familial phylogeny of the Tetraodontiformes (Acanthopterygii: Pisces) as evidenced by their comparative myology. *Smithson. Contrib. Zool.*, (155), i -iii +1 201.

YABE, M., 1985: Comparative osteology and myology of the superfamily Cottoidea (Pisces: Scorpaeniformes), and its phylogenetic classification. *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **32**(1), 1-130.

ZEHREN, S. J., 1979: The comparative osteology and phylogeny of the Beryciformes (Pisces: Teleostei). Evolutionary Monographs, Univ. Chicago, Chicago, ii +389 pp.

Minoru Ishida

カサゴ亜目魚類の系統分類学的研究

石田　実

カサゴ亜目魚類の系統類縁関係を再構築し、それに基づいた分類体系を提唱するために、55属の全身の筋肉系、骨格系を観察し、95の形質を選択した。

形質の状態は、まず、外群として選んだ一般的なスズキ亜目の状態と一致するものを原始的とした。この比較ができないものは疑いなく特殊なものを派生的とし、それでも決定できないものは、メバル科およびフサカサゴ科に見られるものを原始的とした。系統類縁関係の推定は分岐学的手法を用いた。形質状態は等価と仮定し、原則として形質状態の逆転を認めなかった。分岐図は進化の段階数が最も少なくなるものを選んだ。

カサゴ目の他の分類群がカサゴ亜目に属しない先祖から派生したこと、従ってカサゴ亜目が自然群であることを明らかにした。構築した分岐図から55属について系統類縁関係を推定し、それに基づいて、4新科を含む11科を設定した。これらは以下の順序で派生したと推察された：メバル科、シロカサゴ科＋ヒレナガカサゴ科、フサカサゴ科、ハチ科＋ハオコゼ科、オニオコゼ科＋フエフキオコゼ科、Gnathanacanthidae、イボオコゼ科、および Pataecidae。

南西水研研報
Bull. Nansei Natl. Fish.
Res. Inst. No.27, 113 128, 1994

養殖ヒラメ無眼側皮膚の微細構造とその体色異常性の組織学的検討

鈴 木 伸 洋

Ultrastructure of the Skin on Reverse Side of Hatchery-Reared Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus* with Reference to the Pigmentation

Nobuhiro SUZUKI

Ultrastructure of the skin on the reverse side of a hatchery-reared pseudoalbinic Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after metamorphosis was observed. The skin was similar in general structure to that of other flat fish, but such the previously undescribed cells as chloride cells and blood capillaries were observed throughout the epidermis. The integrity of the guanophore system was complete in both of unpigmented and partially pigmented areas. Many melanophages migrating around a melanocyte or melanoblast were observed in the unpigmented areas and they are involved in phagocytosis of melanin. On the contraly, in the partially pigmented areas, no melanophages were observed and melanin-bearing epithelial malpighian filamentous cells were found throughout basal layer of the epidermis. Melanin-bearing melanocytes, amelanotic melanocytes and melanosome complex (degenerative melanocytes which lack the ability to activate the tyrosinase) were also recognized throughout *stratum spongiosum* of the dermis in the partially pigmented areas. Some components of the skin, such as eye position, shape of scales, body color, mucus cell density, and the number of epidermal filament-containing cells, intraepithelial blood vessels and chloride cells changed asymmetrically on both sides of the skin in the process of metamorphosis. The asymmetrical formation process is thought to be due the cell differentiation on the obverse side and pedomorphism on the reverse side through the adaptive characteristics in relation to a bottom life style. In addition to this it is suggested that the pigmentation of the reverse side skin is dependent on lymph functional disorder in relation to the differentiation of melanin.

Key words: flounder, skin structure, pseudoalbinism, melanophage, metamorphosis

ヒラメの増養殖過程においてみられる，有眼側の白化の要因（SEIKAI 1985a, b, SEIKAI *et al*. 1987）やその機構（KANAZAWA, 1993）が明らかにされつつある。一方，無眼側における異常な着色が変態完了後に発現することが知られ，飼育期間が長いほど異常個体の出現率が高いこと，それには無眼側への光照射が大きく影響すること，さらに市販の配合飼料への依存度

1994年1月19日受理，南西海区水産研究所業績A第27号，〒739-04　広島県佐伯郡大野町
本研究の大要は平成5年度日本水産学会秋季大会において発表した．

が高い場合にも皮膚が部分的にでも黒化する個体の出現率が高くなることが経験的に知られるようになった（高橋 1992）。しかし，供試魚の履歴や有眼側の体色の異常発現状態が無眼側への着色にも関連する（青海 1989）など，その異常発現機構は複雑である。このようなことから，ヒラメの体色異常については飼育方法や飼育環境ならびに餌料の栄養強化の方法など，いろいろな飼育条件を照し合わせた再検討が必要であることが提言されている（高橋 1992）。

一方，異体類の皮膚の微細構造については，孵化直後仔魚から4歳の成魚まで大西洋産ツノガシラカレイの一種であるプレース（以下同じ），*Pleuronectes platessa*，を材料に有眼側の皮膚構造について詳細な研究がなされている（ROBERTS *et al*. 1971, 1973）。また，ヒラメ，*Paralichthys olivaceus*，については，変態期の仔魚で体両側の皮膚における色素細胞分化について電子顕微鏡的研究が行われている（SEIKAI 1992）。しかし，変態完了後の無眼側の色素細胞の分化と体色の異常性については詳細な報告がない。

本研究は，ヒラメ無眼側皮膚の異常体色発現機構を解明する手始めとして，無眼側が変態完了後に部分的に黒化したヒラメを用いて，無眼側の皮膚の構造と皮膚の色素沈着に関する超微形態的な観察を行った。

材料及び方法

広島県下の養殖場で生産されたヒラメ仔魚を室内の250ℓのFRP角型水槽で市販の配合飼料（ヒガシマル配合固形飼料）を与えて室内の自然光下で流水飼育（水温16.6～18.1℃，塩分約30）した。変態を完了した個体（南1982のステージIに相当）の中から，外観上形態，運動機能および有眼側の皮膚の色素沈着が正常かつ無眼側の皮膚の全面に色素沈着が点状に散在した状態で生じている，いわゆる部分黒化個体1尾（全長68.3㎜）を選んで供試魚とした。無眼側皮膚の正常部位（白色部分）と異常部位（黒色部分）にそれぞれ0.2モルのカコジレート緩衝液でpH7.5に調整した2.25％パラフォルムアルデヒドと2％グルタールアルデヒドの混合液を滴下しながら，ほぼ3㎜大に筋肉層までメスを入れ切除し，切除した部分の鱗を数枚抜き取った。切除した組織片を前報（鈴木 1993）に従って電顕用超薄切片を作製し，酢酸ウラニルとクエン酸鉛の二重染色を施して日立HU-12型電子顕微鏡を用いて加速電圧80KVで観察した。また，鱗を0.2モルのカコジレート緩衝液で洗浄後，1％サイアニンブルRで染色して光学顕微鏡で観察した。

結　　果

1．表　皮

表皮は，4から6つの細胞層から成り，最外層は主に非角化性の単層扁平上皮で構成され，遊離表面には微小堤を備えている。基本細胞単位としては，線維細胞（filament-containing cell），塩類細胞（chloride cell），血管（blood capillary）とその内皮細胞（Figs. 1，2）およ

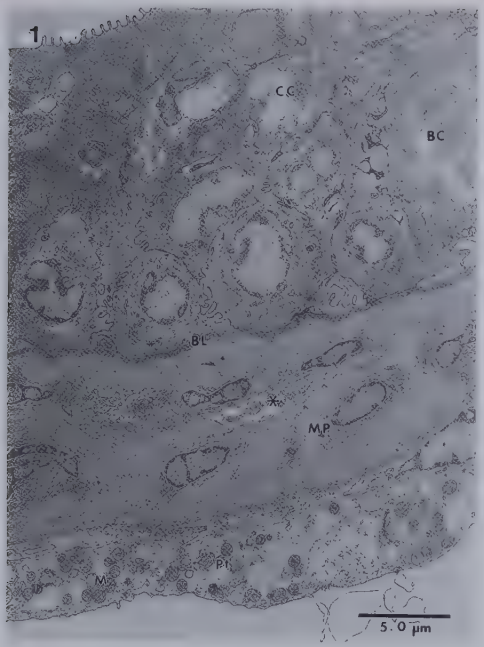


Fig. 1 Cross section of the unpigmented (normal) skin throughout an abdominal part of the trunk (68.3mm in TL). Asterisk indicates a melanoblast. BC: blood capillary, BL, basement lamella, CC: chloride cell, M: mitochondorion, MP: melanophage, Pt: peritoneum.

びエオジンに濃染する分泌顆粒を含有した細胞（eosinophilic granule cell）などが認められた（Fig. 3）。最外層を除く立方上皮線維細胞は，細胞質の大半を細長い直径約 8 nm の張細糸（tonofilament）であるミクロフィラメントが占め，他にグリコーゲン顆粒やミトコンドリアなどの細胞内小器官が存在し，細胞膜間には指状嵌合がよく発達しており，デスモゾームで接着している（Fig. 4）。エオジンに濃染する分泌顆粒を含有した細胞は，細胞質の電子密度が全体的に低く，細胞質にはゴルジ装置複合体と電子密度中程度の楕円形の顆粒が存在し，この細胞は，線維細胞とデスモゾームで接着しており，他の細胞に比べて数が少ない（Fig. 3）。塩類細胞は，線維細胞に次いで数が多く認められた細胞で，線維細胞とは指状嵌合が未発達である（Figs. 1, 2）。成熟した塩類細胞の核は不定形で小さく，細胞質には棚状クリステの発達したミトコンドリアと無顆粒の小胞が多数存在し，この小胞の周囲には遊離のリボゾームが多数集合し，ところどころにライソゾームに類似した電子密度中程度の物質を含有した小胞と微小管が認められた(Fig. 5)。表皮内血管とその内皮細胞は，表皮の中では最も大きな組織で，線維細胞と指状嵌合を形成し，デスモゾームで接着している。血管内皮は，電子密度の高い収縮性の中間系フィラメントで構成されており，血管内腔には血球が観察されることからここには血流があり，表皮の厚さの半分程度を占める内腔（短径 約13μm）の大きな血管も認められた(Figs. 6, 7)。

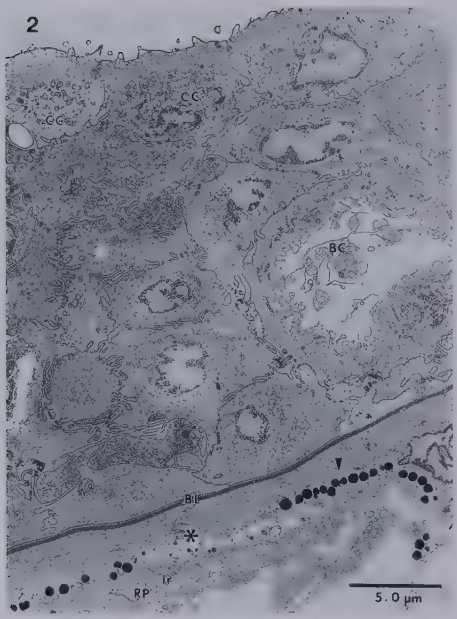


Fig. 2. Cross section of the pseudoalbinic (abnormal) pigmented skin throughout a posterior part of the trunk (68.3 mm in TL). Melanin-bearing melanoblasts (arrow head) and amelanotic melanoblasts (asterisk) found in the darmal layer. BC: blood capillary, BL: basement lamella, CC: chloride cell, Ir: irridopores, RP: reflecting platelet.

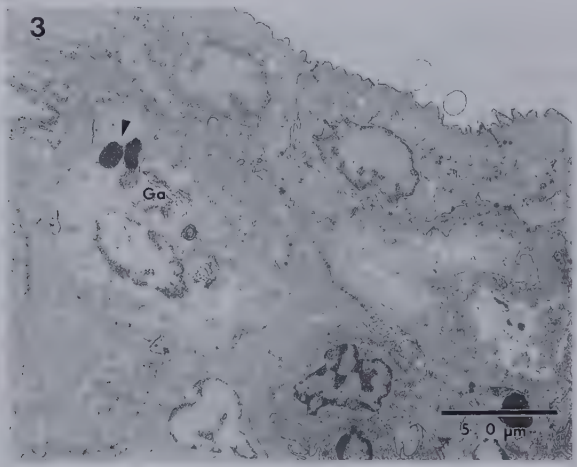


Fig.3. Eosinophilic secretory granules (arrow head) containing cell found in the epidermis. Ga: Golgi apparatus.

皮膚の正常部位（白色部分）の表皮には色素細胞は認められないが（Fig. 1），異常部位（黒色部分）の表皮では，表皮基底の線維性胚芽細胞（epithelial malpighian filamentous cell）に

Fig. 4. Epithelial malpighian filamentous cell contained a few of melanosomes in the cytoplasm. BL, basement lamella, D, desmosome, Mf: microfilament.

黒色素顆粒の出現がみられた。この色素顆粒は限界膜に包まれ，真皮性黒色素顆粒と同じ高電子密度のメラニン様物質を含有していた（Fig. 4）。

2．真　皮

真皮層は，筋原線維が規則正しく密に配列した緻密層（reticulum）と膠原線維が無秩序に粗に配列した海綿体層（spongiosum）に識別され，骨格筋（skeletal muscle）と真皮（dermis）との間に存在する皮下組織（hypodermis）が薄いことが特徴的である（Fig. 8）。真皮色素単位は海綿体層に認められ（Figs. 1，2），色素細胞には細胞接着装置の分化が認められず，この細胞の周囲には血管と神経が分布していた（Fig. 8）。

正常部位の皮膚の鱗は円鱗で，真皮色素単位としては反射小板（reflecting platelet）を備えた反射性細胞（irridophore）が存在する。反射小板は薄板あるいは扁平な顆粒状の結晶体で，小胞体内腔には結晶物の形成が認められた。小板間には微細な線維構造が観察されるが，その構造は緻密ではない（Fig. 8）。しかし，反射性細胞に混存して黒色素芽細胞（melanoblast）の周囲に多数集合した粗大顆粒細胞（melanophage）が認められた（Fig. 1）。この細胞は，細胞質突起を出して真皮層を遊走する細胞で，不定形の大きな核をもっている。細胞質には，粗面小胞体がよく発達しており，ライソゾーム様の顆粒が認められた（Fig. 9）。これに対して，色素異常部位の皮膚には，鱗の後縁部に不規則な配列の小棘を備えた偽櫛鱗が存在し，粗大顆粒細胞は認められず，真皮色素単位として反射性細胞と混在して黒色素胞（melanocyte）が観

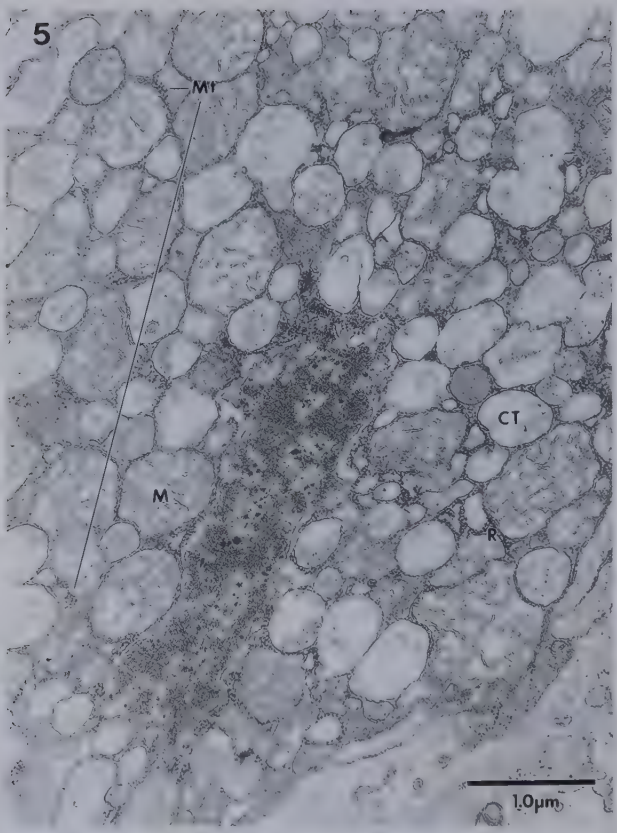
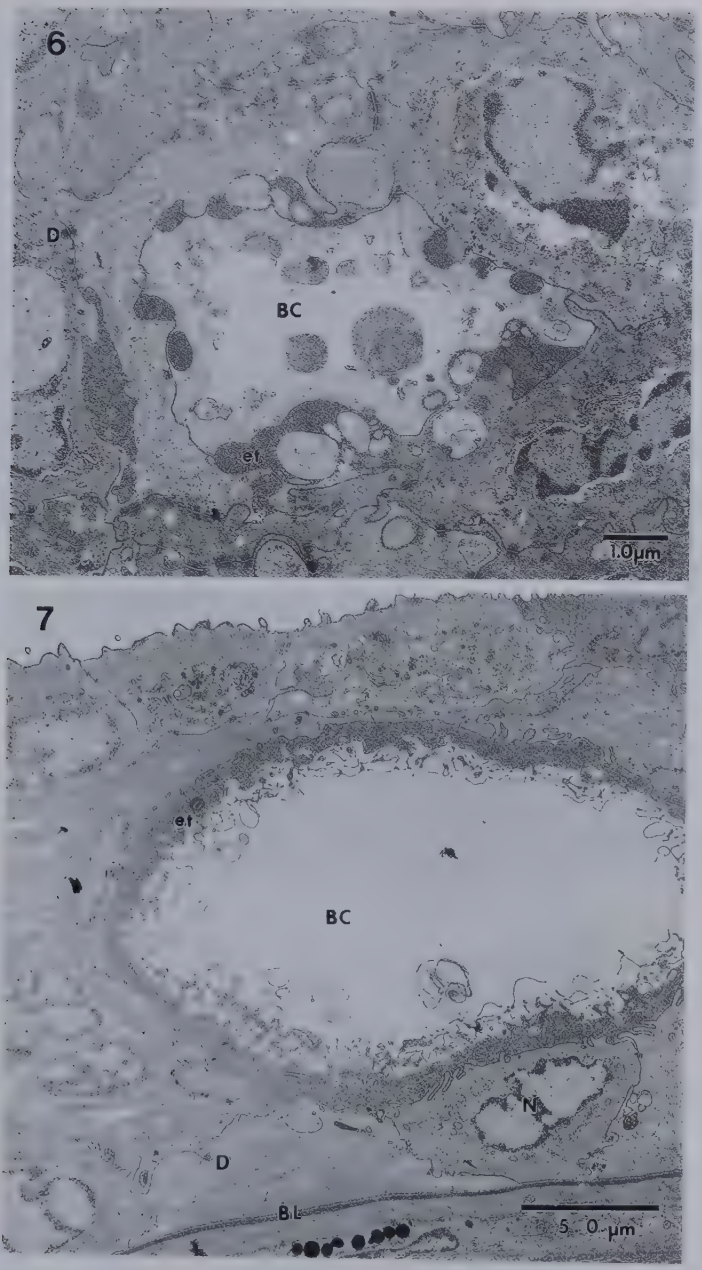


Fig. 5. Enlarged view of matured chloride cell found in the epidermis. The cytoplasm is mostly occupied by a large number of mitochondria (M) and a net work of agranular cytoplasmic tubles (CT). Free rebosomes (R) and microtubles (Mt) are distributed among the tubles.

察された(Fig. 2)。成熟色素顆粒を形成している黒色素胞の細胞膜には，多数の取り込み小胞の構造がみられ，細胞質にはミトコンドリア，ゴルジ装置，遊離のリボゾーム，微小管などの細胞内小器官と神経突起の末端が認められた (Fig. 10, 11)。また黒色素顆粒 (melanosome) の成熟過程において，空胞内にメラニンの形成が進行しているプレメラノソーム (premelanosome) や空胞内に渦巻き状の繊維構造のみがみられるプレメラノソームが認められ (Figs. 12, 13)，メラニンが後形質化した黒色素顆粒は，メラニン物質と限界膜との間に間隙が形成され，顆粒の芯が明瞭であった(Fig. 11)。しかし，黒色素胞はすべてが成熟色素顆粒を形成するわけではなく，メラニン形成過程において機能低下して成熟色素顆粒を形成することなく自己崩壊してしまうもの (Fig. 14) も認められた。



Figs. 6. 7. Enlarged views of the blood capillaries in the epidermis. Nucleated blood corpuscle is clearly observed in the small blood capillary (BC), but endothelium (et) is poorly developed. Endothelium of the large blood capillary is well developed. BL: basement lamella, D: desmosome, N: nucleus of endothelium.

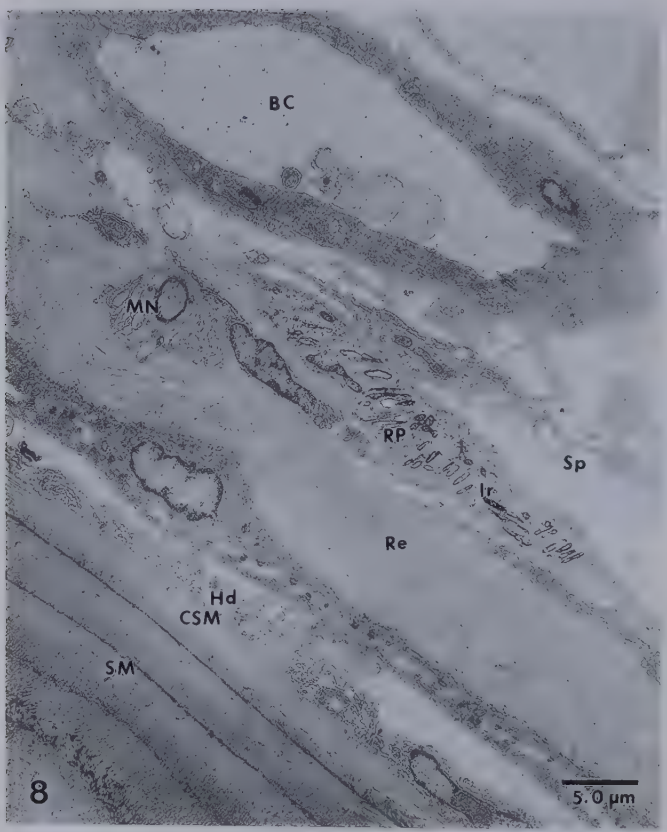


Fig. 8. Spongiform strata (Sp) and reticular compact strata (Re) found in the dermis. Hypodermis (Hd) between the dermis and the skeletal muscles (SM) is poorly developed. A layer of cross-striated collagen muscle (CSM) demarcated the strata of skeletal muscle and hypodermis is shown. Blood capillary (BC) and myelinated nerve fibers (MN) are occasionally observed around irridophores (Ir) showing groups of lamellar structure. RP: reflecting platelet.

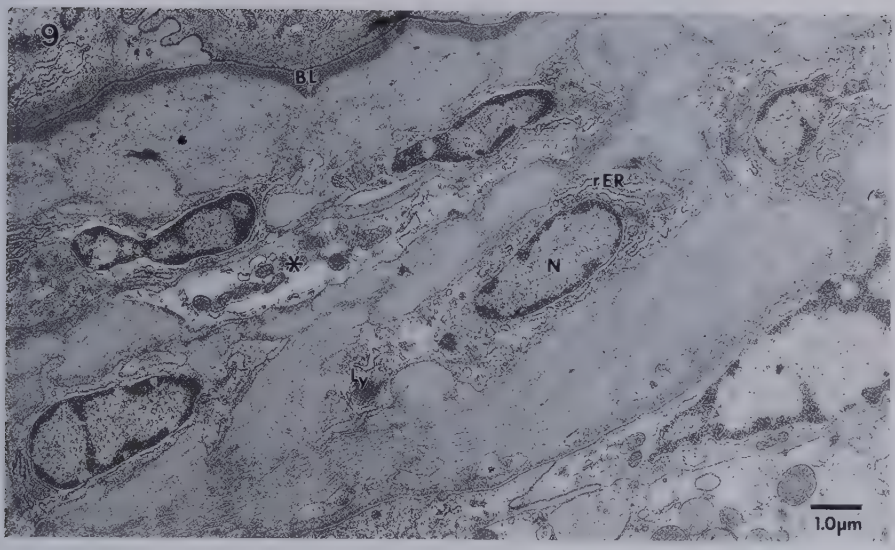


Fig. 9. Enlarged view of intradermal melanophage found in the normal unpigmented skin. Many melanophages with well-developed rough surfaced endoplasmic reticula (rER) and elongated pseudopodia aggregated around a melanoblast (asterisk). BL: basement lamella, Ly: lysosome-like body. N: nucleus.

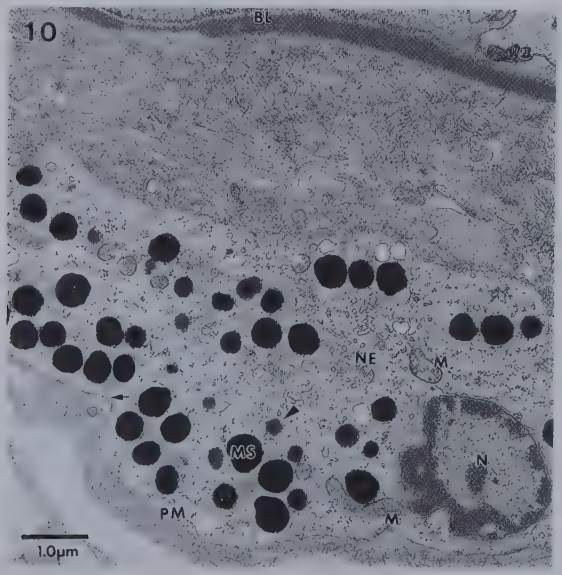


Fig. 10. Dermal melanin-bearing melanocyte found in the pseudoalbinic pigmented skin. Endocytosis or exocytosis (arrow) are observed in the plasma membrane (PM). The melanocyte contains the large number of melanosomes (MS) and premelanosomes (arrow head) in the cytoplasm. BL: basement lamella, M: mitochondoria, N: nucleus, NE, nerve ending.

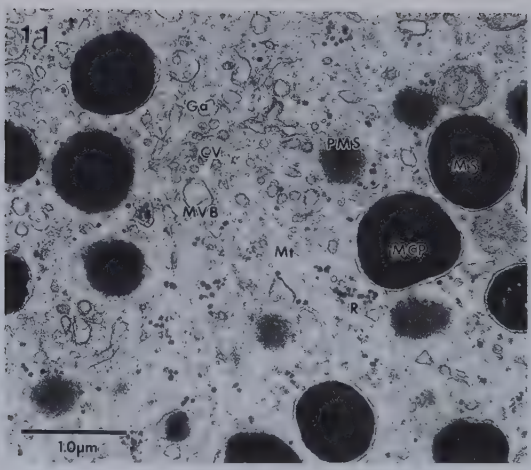
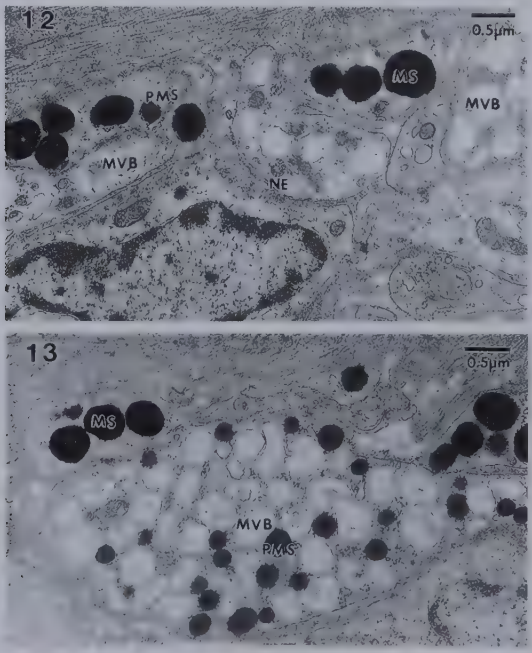


Fig. 11. Enlargement of the melanocyte in Fig. 10. Golgi apparatus (Ga) with coated vacuoles (CV) and multivesicular bodies (MVB) develops. A single membrane structure not clear in premelanosomes (PMS) but clear in melanosome (MS) with melanin core particles (MCP). Mt: microtuble, R: free rebosome.



Figs. 12, 13. Premelanocytes bearing-amelanotic melanosomes found in the pseudoalbinic pigmented skin. Amelanotic melanocytes contain only the large number of premelanosomes (PMS) and multivesicular bodies (MVB). MS: melanosome, NE: nerve ending.

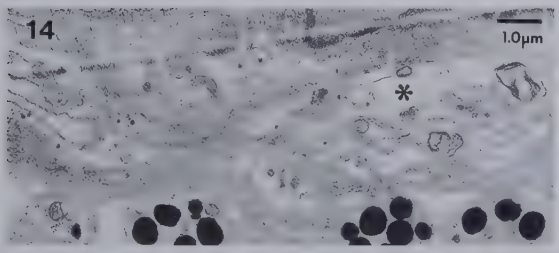


Fig. 14. Melanosome complex (asterisk) found in the pseudoalbinic pigmented skin.

考　　察

プレースの変態前の仔魚では，有眼側表皮に塩類細胞の存在が観察され，この塩類細胞の特徴はヒラメの場合でみられたようにミトコンドリアと無顆粒の細胞小胞がよく発達した構造である。そして，この塩類細胞は変態始動期より減少を開始して変態を完了している孵化60日目の稚魚では認められなくなるという（ROBERTS *et al*. 1973)。一方，変態完了後の異体類の皮膚の分化については詳細な報告がなく，特に無眼側皮膚での塩類細胞と表皮内血管の存在の確認は今回がはじめてである。

魚類の表皮内毛細血管網の存在は変則的なものとされ，水からはい上がる習性をもち，皮膚呼吸をするトビハゼ類の表皮で特に発達しており，これは陸上生活に伴って特別に分化したものと考えられてきた（SCHÖTTLE 1932, HARMS 1935, 前川ほか 1968)。しかし，魚類は多かれ少なかれ皮膚呼吸の全呼吸量に占める割合が５ないし30％とされ（FEDER and BURGGREN 1986)，主に鰓呼吸依存型とされる魚類のなかにも表皮内毛細血管網をもつ種類が存在することが明らかになり（鈴木・平木 1991)，これらの魚種ではこれが皮膚呼吸機能を増大させるためのものと解釈されている（SUZUKI 1992)。酸素や二酸化炭素が皮膚を通して移動するためには，これらの分子分圧が皮膚の外側と内側とで異なることが前提条件となる。魚類の心臓は，区画が不完全で動脈血が静脈血に混ざる。特に鰓が分化していない発生初期の仔魚の場合，左後主静脈に分化するキュービエ管に血液が流れ込み，酸素分圧の低い静脈血が皮膚を通過する時に外界から酸素を取り入れると同時に皮膚は二酸化炭素を排出する。このように，皮膚表面に毛細血管網が分布することはガス交換を効率よく行うために極めて都合がよい（鈴木・平木 1991)。ヒラメの変態仔魚は，河口前面の比較的浅い砂浜域に着底することが知られている。この海域は河川水が流入する比較的環境変化の激しい場所である（TANAKA *et al*. 1989, GOTO 1989, FUJII *et al*. 1989, SUBIYANTO *et al*. 1993, etc)。この場所で底生生活を過す本種において，浸透圧調節や呼吸のための鰓のイオンおよびガス交換の機能を補足する上で表皮内に塩類細胞と毛細血管網が存在することは極めて合目的な構造と考えられる。

ヒラメおよびプレースの有眼側皮膚では変態始動期から粘液細胞が増加することが知られている（ROBERTS *et al*. 1973, SEIKAI, 1992)。一方，ヒラメの無眼側表皮では粘液細胞は極めて

少なく，電子密度中程度の楕円形の顆粒を含有した細胞が少数観察された。この細胞は，顆粒がエオジンに濃染する（鈴木，未発表）ことから，ROBERTS *et al*.（1971）がプレース成魚で報告している哺乳類の白血球細胞と相同の機能をもつ eosinophilic granule cell と形態的に同じものと推定された。Eosinophilic granule cell は，表皮内に浸潤したメラニンの移送・排出にとって重要な役割を果すことが報告されている（ROBERTS *et al*. 1971, 1973）。今回ヒラメでこの細胞が表皮内に浸潤したメラニンを排出している像は観察されなかったが，皮膚の色素異常部位の表皮にこの細胞の存在が確認されたことは，ヒラメにおけるメラニンの移送・排出経路を考える上で興味あることである。

また，変態完了後の全長40㎜以上のヒラメで無眼側への光照射が無眼側の体色異常に大きく影響すること（青海 1989），そして有眼側の体色異常個体でも個体の成長に伴って皮膚の白色部位に色素が二次的に出現する場合があり，特にこの現象が屋外飼育魚で明瞭である（鈴木，未発表）ことなどから，今回観察されたような表皮内への黒色素顆粒の出現は，強い反射光に対する生体防御反応（藤井 1976）の一つと考えられた。

ヒラメの変態始動期における有眼側と無眼側の皮膚の色素細胞分化に関する透過型電子顕微鏡観察によれば，変態の進行に伴って，体色の正常な仔魚では有眼側で真皮性色素芽細胞の分化が促進され，無眼側ではそれが萎縮崩壊するが，体色の異常な仔魚では両体側で色素芽細胞の萎縮崩壊が観察されている（SEIKAI 1992）。今回は，外観上有眼側の着色が正常で，かつ無眼側が部分的に黒化している変態を完了した稚魚において，無眼側の皮膚の白色部分（正常部位）と黒色部分（異常部位）の真皮性色素細胞の動態について検討した。

白色部分では反射小板を備えた反射性細胞に混在して黒色素芽細胞がみられ，その細胞の周囲には多数の粗大顆粒細胞が集合していることが明らかとなった。この細胞は，形態的にみてマクロファージの一種である黒色素顆粒を貪食するメラノファージ（melanophage）であると考えられた。これに対して，黒色部分ではメラノファージの存在が認められず，反射性細胞に加えて黒色素胞が多数観察された。この黒色素胞は，細胞質の空胞内にメラニンを沈着させて成熟黒色素顆粒に成長するものから，空胞内に渦巻状の繊維構造のみが存在する状態のものおよびメラニン形成過程でメラノソーム複合体（melanosome complex）を形成して自己貪食による崩壊が進行している，いわゆる非メラニン性黒色素胞（amelanotic melanophore）の形態までさまざまであった。この非メラニン性黒色素胞は，活性チロシナーゼの欠損あるいは基質のチロシン補給不全などメラニン形成過程のどこかの段階で機能が低下して色素顆粒の黒化が部分的あるいは完全に阻害されたものと考えられている（藤井 1976）。黒色素芽細胞におけるメラニンの産生と分化には誘導因子（melanophore stimilating hormone）と阻止因子（melanization inhibiting factor）が知られており，ヒラメの場合も皮膚組織にある黒色素分化誘導因子と阻止因子の調節の異常性が体色異常の原因となっていることが示唆されている*1。従って，無眼側皮膚の黒色部位では黒色素分化誘導因子と阻止因子の調節の異常性によってメ

*1 豊原治彦・徳田有希・浅野史郎・木下政人・坂口守彦（1993）：魚類の色素細胞分化調節因子（II）両面有色ヒラメ皮膚組織における黒色素分化調節機構の異常性．平成5年度日本水産学会春季大会講演要旨，p.146.

ラノソーム複合体による自己崩壊や色素顆粒に対するメラノファージなどのリンパ系由来の細胞の貪食機能の低下が生じて色素顆粒の黒化が部分的に起こったものと推察された。

ヒラメの無眼側の体色異常には，変態完了時にすでに着色が起こっているものと変態完了後に着色が生じるものの2型がある(高橋 1992)。前者の場合には，全長20㎜前後の着底前の種苗で有眼側の皮膚の着色の有無と無眼側の皮膚の着色に関連性が認められず(高橋 1992)，後者では脂溶性ビタミンの多量添加が有眼側のみならず無眼側の体色異常も引き起こしている可能性が示唆されている(三木ほか 1989,高橋 1992)。一方，有眼側の色素が欠如する機構として，網膜形成にリン脂質とビタミンAが不足することで，目の網膜中の暗視能を司る桿体の光感受性物質ロドプシンの形成が阻止されて網膜機能の開始が遅れるために光情報が中枢へ伝達されず，結果として内分泌器官からホルモン分泌がないために黒色素形成が阻止されることが知られている（KANAZAWA 1993)。

異体類の変態完了後の両体側の皮膚の形態形成は次の過程を経るものと推察される。すなわち，変態を通じて眼の移動が起こり，体側は有眼側で鱗の色素沈着に伴って円鱗から櫛鱗に変化し（KIKUCHI and MAKINO 1990)，粘液細胞の数（ROBERTS *et al*. 1973, SEIKAI 1992）と表皮細胞の数の増加に伴って塩類細胞は萎縮するなど変態完了後に皮膚は成魚型へと移行する

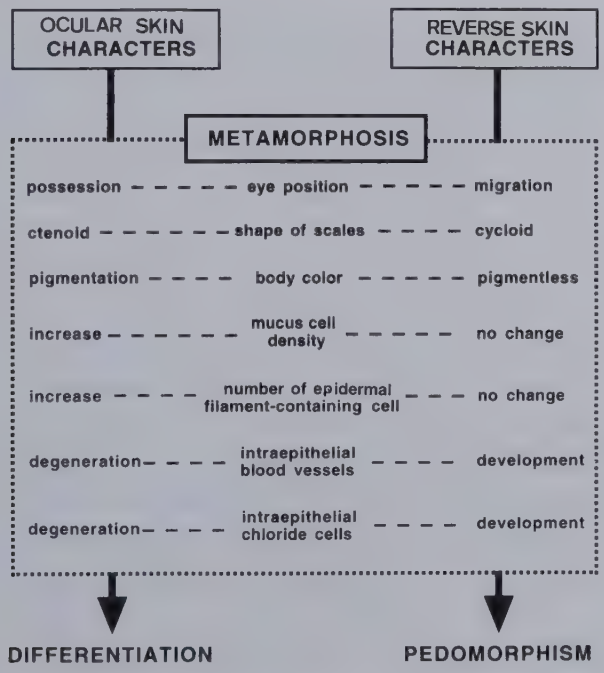


Fig.15. Schema showing asymmetrical changes in some components on the both sides of the flatfish skin in process of metamorphosis. The pattern of asymmetrical formation supported by the adaptive characteristics in relation to a bottom life style is describable as differentiation on obverse side and as pedomrophism on reverse side.

(ROBERTS *et al*. 1973)。これに対して，無眼側では黒色素の沈着が起こらず，鱗も円鱗のままで粘液細胞数の増加も認められない（KIKUCHI and MAKINO 1990, SEIKAI 1992)。加えて，表皮内に塩類細胞と毛細血管が残存して機能的であるなど変態を完了しても浮遊生活期の皮膚と同じ原型的形態形質を保有している（Fig. 15)。従って，異体類は変態期に底生生活に移行するための生態適応として，このように両体側の皮膚で形態形成が異なっていると考えられる。そして，ヒラメの無眼側の体色異常は，偽櫛鱗の形成（KIKUCHI and MAKINO, 1990, SEIKAI, 1992）や粘液細胞の増加[*2]などを伴うことから変態期の皮膚における形態形成不全の一つと考えられる。

以上のようなことから，養殖ヒラメの異常体色発現機構を解明するために，栄養生理学的側面のほか今回の観察から明らかになったように表皮内への黒色素顆粒の出現に及ぼす強い反射光などの影響や変態期の皮膚の形態形成不全を伴う体色異常に関わる真皮性黒色素顆粒に対する自己貪食能やメラノファージの貪食機構に及ぼす生理的障害を追求することが必要と考えられる。

要　　約

変態完了後（ステージⅠ）の養殖ヒラメの無眼側部分黒化個体について，皮膚の着色が正常な部位と異常な部位とを透過型電子顕微鏡を用いて組織学的に比較し，無眼側の皮膚の構造と色素沈着について記述した。体色正常部位（白色部分）の表皮には稀に線維細胞内に黒色素顆粒の侵入がみられ，これは強い光反射による生体防御の一つと考えられた。また、真皮に反射性細胞に混在して黒色素芽細胞が認められたが，この細胞の周囲には大食細胞（メラノファージ）が多数集合して黒色素顆粒を貪食すると考えられた。これに対して，体色異常部位（黒色部分）では真皮性色素単位として反射性細胞に混存して黒色素胞が認められた。この色素胞の空胞内には，メラニン蛋白質が分泌されて成熟黒色素顆粒に成っているものおよびこの分泌が起らずメラニン形成過程で機能低下して自己崩壊してしまうものなどいろいろの様相を呈した。このことから、無眼側の体色正常部位では黒色素顆粒が大食細胞によって貪食されるのに対して、異常部位ではこの色素顆粒の自己崩壊やメラノファージによる色素顆粒の貪食機能の不全によって黒色素胞でのメラニン産生と分化の調整に異常が生じているものと解釈された。ヒラメの異常体色発現機構を解明するためには、今回の観察から明らかになった表皮内への黒色素顆粒の出現に及ぼす強い反射光等の影響や変態期の皮膚の形態形成不全を伴う黒色素顆粒の自己崩壊およびメラノファージによる代謝機構に及ぼす生理的障害を追究することが必要と考えられる。

*2吉田晋平(1993)：放流技術と種苗性－ヒラメを中心として－シンポジウム．栽培漁業の課題と展望．種苗放流事業の発展を妨げる原因と解決方法．講演要旨．p.5.東京大学海洋研究所．

文　　献

FEDER,M.E. and W.W.BURGGREN,1986: 脊椎動物の皮膚呼吸．サイエンス（日本版），**16**(1),94 103.

藤井良三,1976: 色素細胞．ＵＰバイオロジーシリーズ 10，東京大学出版会，東京，135pp.

FUJII,T.,H.SUDO,M.AZETA and M.TANAKA,1989: Settling process of larvae and juveniles of Japanese flounder, in Shijiki Bay, Hirado Island. *Nippon Suisan Gakkaishi,***55**(1),17-23.

GOTO,T., H.SUDO, M.TOMIYAMA and M.TANAKA, 1989: Settling period of larvae and juveniles of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Shijiki Bay, Hirado Island. *Nippon Suisan Gakkaishi,***55**(1),9-16.

HARMS,J.W.,1935: Die Reablisation von Genen und die Consecutio Adaptation. 4. Experimentell hervorgerufener Medienwechsel: Wasser zu Feuchtluft biz zu Trockenluft bei Gobuformes (*Gobius, Baleophthalumus* und *Periophthalmus*). *Z. Wiss.Zool.,***140**,1-114.

KANAZAWA,K.,1993 : Nutritional mechanisms involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery-reared flatfish. *J. World Aquacuture Soc.,***24**(2),162-166.

KIKUCHI,S. and N.MAKINO, 1990: Characteristics of the progression of squamation and the formation of ctenii in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus. J. Exp.Zool.,***254,**177-185.

前川久太郎・福田芳生・岡田仁一・今村　薫,1968: 魚類の空気呼吸器に見られる上皮内血管について．東医大誌,**26**(5),793-799.

三木教立・谷口朝宏・浜川秀夫・山田幸夫・桜井則広, 1990: ビタミンＡ投与ワムシ給餌によるヒラメ白化防除．水産増殖, **38**(2), 147-155.

南卓志,1982: ヒラメの初期生活史．日水誌,**48**(11),1581-1588.

ROBERTS,R.J.,H.YOUNG and J.A.MILNE,1971: Studies on the skin of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) I. The structure and ultrastructure of normal plaice skin. *J.Fish Biol.,***4**,87-98

ROBERTS,R.J.,M.BELL and H.YOUNG,1973: Studies on the skin of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) II. The development of larval plaice skin. *J.Fish Biol.,***4**,103-108.

SCHÖTTLE,E.,1932 : Morphologie und Physiologie der Atmung bei Wasser-, Schlamm und Landlebenden Gobuformes. *Z.Wiss.Zool.,***146**,417-462.

SEIKAI,T.,1985a: Influence of feeding periods of Brazilian *Artemia* during larval development of hatchery-reared flounder *Paralichthys olivaceus* on the appearance of albnism. *Nippon Suisan Gakkaishi,***51**(4),521-527.

SEIKAI,T.,1985b: Reduction on occurrence frequency of albinism in juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery-reared on wild zooplankton. *Nippon Suisan Gakkaishi,***51**(8),1261-1267.

青海忠久, 1989: 異体類人工種苗の体色異常の発現機構に関する研究．平成元年度健苗育成技術開発委託事業報告．日本栽培漁業協会, 1-12.

SEIKAI,T.,1992: Process of pigment cell differentiation in skin on the left and right sides of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus,* during metamorphosis. *Japan J. Ichthyol.,***39**(1),85 92.

SEIKAI,T.J.MATSUMOTO,M.SHIMOZAKI,A.OIKAWA and T.AKIYAMA,1987 : An association of melanophores appearing at metamorphosis as vehicles of asymmetric skin color fromation with pigment anomalies in the Japanese flounder,*Paralichthys olivaceus. Pigment Cell Res.,***1**, 143-151.

SUBIYANTO,I.HIRATA and T.SENTA, 1993: Larval settlement of the flounder on sand beaches of the Yatsushiro Sea, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi,* **59**(7),1121-1128.

SUZUKI,N.,1992: Fine structure of the epidermis of the mudskipper, *Periophthalumus modestus* (Gobiidae). *Japan J. Ichthyol.,* **38**(4), 379-396.

鈴木伸洋,1993: 海産魚類マハゼの腸管上皮細胞の微細構造．南西水研研報，(26),113 132.

鈴木伸洋・平木雅之,1991: 魚類数種の表皮に見られた上皮内血管について．神奈川自然保全研究会報，

(10),1-11.

高橋庸一,1992: ヒラメの種苗生産における体色異常個体の出現と防除－体色異常防除試験報告書－.日本栽培漁業協会特別報告, (3),1-50.

TANAKA,M. T. GOTO, M. TOMIYAMA and H. SUDO,1989: Immigration, settlement and mortality of flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae and juveniles in a nursery ground, Shijiki Bay, Japan. *Neth.J.Sea Res.*,**24**,57-67.

南西水研研報
Bull. Nansei. Natl. Fish.
Res. Inst. No.27. 129-231. 1994

ヒラメラブドウイルス（*Rhabdovirus olivaceus*）の感染症に関する研究

大迫典久

Pathology for hirame rhabdovirus (*Rhabdovirus olivaceus*)

Norihisa OSEKO

Hirame rhabdovirus (HRV, *Rhabdovirus olivaceus*) was recently discovered from moribund hirame (*Paralichthys olivaceus*) and has been found widely in the Japanese hirame culture farms and it also is thought to have pathogenicity to salmonid fish. To establish the prevention technique of the disease by HRV in salmonid fish, histopathological observations for the salmonids and hirame and examination of HRV pathogenicity in salmonids were made.

Diseased fish showed hemorrhage in muscle, congestion of gonad and accumulation of ascitic fluid in hirame. Histopathological observation showed necrosis and hemorrage in kidney and spleen. Hyperemia and hemorrhage were observed in the tissue of somatic muscle, alimentary tract, testis and ovary.

Pathogenicity of the HRV was shown in rainbow trout; *Oncorhynchus mykiss* and masu salmon ; *O.masou* in salmonid fish (rainbow trout, masu salmon, chum salmon; *O.keta*, coho salmon; *O.kisutch*, and pink salmon; *O. gorbuscha*) by artificial infection.

Club-like or cord-like structures were easily recognized on the cell surface of HRV infected rainbow trout gonad cells (RTG-2) by electromicroscopical observations. Most of them contained many viral particles on the surface. These morphological characters were of HRV.

On the artificial infection of HRV to hirame, any symptoms of the disease was not observed at water temperature higher than 15℃ in the range examined between 5 and 20℃. This indicated that regulation of breeding water temperature was effective for prevention of HRV infection. The ultraviolet irradiation of $6.0 \sim 7.8 \times 10^3 \mu W \cdot sec/cm^2$ and disinfectants (500ppm of saponated cresol, 200ppm of benzalkonium chloride, 100ppm of iodine and 50ppm of sodium hypochlorite) were effective to inactivate HRV.

Key word: *Rhabdovirus olivaceus* (hirame rhabdovirus; HRV), hirame (*Paralichthys olivaceus*), histopathology, pathogenicity, prevention.

目　　次

緒　言……130
第Ⅰ章　ヒラメにおけるHRV感染症の発生状況および病理組織学的特徴……132
　第1節　HRV感染症の発生過程および被害状況……132

1994年1月19日受理，南西海区水産研究所業績A第28号，〒739-04　広島県佐伯郡大野町

第2節　HRV 自然発病ヒラメの病理組織像 ……138
第II章　HRV のサケ科魚類に対する病原性およびその病理組織像 ……143
第1節　HRV のサケ科魚類に対する病原性 ……143
第2節　HRV のニジマスに対する病原性 ……147
第3節　HRV 人工感染ニジマスの病理組織像 ……157
第III章　In vitro および in vivo における HRV の感染細胞中での増殖像 ……161
第1節　In vitro における HRV の増殖像 ……162
第2節　In vivo における HRV の増殖像 ……168
第IV章　HRV の防除対策の検討 ……170
第1節　HRV 感染発症に及ぼす水温の影響 ……171
第2節　紫外線および各種消毒剤の HRV 不活化効果 ……179
総　括 ……186
要　約 ……191
謝　辞 ……193
参考文献 ……193

緒　　言

近年，わが国の沿岸海域では天然資源の増大を目的とした増殖事業と，より高い生産性を追求した養殖事業が推し進められている。養殖事業では生産性の追求から養魚は限られた環境下に生活することを余儀なくされ，ひとたび細菌やウィルス等による感染症が発生すると，その高い伝播性により甚大な被害を被ることから，感染症防除対策は養殖業における大きな課題となっている。

1984年3月，兵庫県の淡路島で，翌年3月兵庫県水産試験場，北海道の焼尻島および香川県の女木島において，いずれも体表や鰭の充出血，腹部膨満，生殖腺のうっ血，筋肉内出血などを主徴とする養殖ヒラメ（*Paralichthys olivaceus*）の疾病が発生し，病魚の各臓器からニジマス生殖線由来細胞（rainbow trout gonad cell：RTG-2（以下同様）；Wolf and Quimby 1969）に IHNV と類似の細胞変性効果（cytopathic effect：CPE（以下同様））を発現するウイルスが分離された。魚類の病原ウィルスに関しては，1962年に初めてサケ科魚類の伝染性膵臓壊死症ウイルス（infectious pancreatic necrosis virus：IPNV（以下同様）；Wolf 1966）が発見されて以来，サケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルス（infectious hematopoietic necrosis virus：IHNV（以下同様）；Amend *et al*.,1969），ウィルス性出血性敗血症ウイルス（viral hemorrhagic septicemia virus：VHSV（以下同様）；Jensen 1963），サケ科魚類のヘルペスウイルス（*Herpesvirus salmonis*；Wolf and Taylor 1975；Wolf *et al*. 1975），十和田湖のヒメマスから発見されたウイルス（nerkavirus in Towada Lake, Akita and Aomori：NeVTA；Sano 1976），サクラマスのウイルス（*Oncorhynchus masou* virus：OMV,

KIMURA *et al*. 1981), シロサケのウイルス (chum salmon virus: CSV; WINTON *et al*. 1981) 等が発見され, またウナギ (*Anguilla rostrata*, *A*. *anguilla*) からはアメリカウナギから分離されたウイルス (eel virus of America: EVA (以下同様); SANO 1976), ヨーロッパウナギから分離されたウイルス (eel virus of Europe unknown: EVEX (以下同様); SANO *et al*. 1977), 並びにウィルス性腎臓病原因ウイルス (eel virus of European eel: EVE; SANO *et al*. 1981a) 等が発見されている。以上の他, 主要な魚類病原ウイルスとしてはコイ (*Cyprinus carpio*) の春ウイルス病ウイルス (spring viremia of carp virus : SVCV ; FIJAN *et al*. 1971) および鰾炎症ウイルス (swimbladder inflamation of carpiovirus : SBIV ; BACHMANN and AHNE 1974), パイク (*Esox lucius*) 稚魚のラブドウイルス病ウイルス (pike fry rhabdovirus :PFRV ; BOOTSMA 1971), アメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) のヘルペスウイルス病原因ウイルス (channel catfish virus: CCV; FIJAN 1968) 等が知られている。また我国の海産養殖魚介類の病原ウイルスとしては, クルマエビ (*Penaeus japonicus*) のバキュロウイルス性中腸腺壊死症 (SANO *et al*.1981b), ブリ (*Seriola quinqueradiata*) のリンホシスティス症 (松里 1975) やウイルス性肝膵壊死症 (反町・原 1985), トラフグ (*Takifugu rubripes*) の口白症 (井上ら1986), さらにシマアジの神経壊死症 (MORI *et al*. 1992), マダイ (*Pagrus major*) のイリドウイルス感染症 (井上ら1992) の原因ウイルスが報告されている。養殖ヒラメから分離されたウイルスはこれらの魚類病原ウイルスとは異なり新しいウイルスと考えられ, 宿主の名にちなみ *Rhabdovirus olivaceus* と命名され (KIMURA *et al*.1986), 一般にヒラメラブドウイルス, 略して HRV と称されている。

HRV はサケ科魚類病原ウイルスの IHNV や VHSV と類似している (西沢 口頭発表*) ことから, サケ科魚類にも感染にする可能性が極めて大であると考えられ, サケ科魚類がわが国冷水域において水産上重要なことを鑑み, その感染・伝播の危険性が憂慮される。そこで本研究では HRV 感染症の発症過程, 発病機構を病理組織学的に究明し, かつ感染防除対策の基礎を確立することを目的として種々の検討を行なった。

まず第 I 章においてこのウイルス感染症の発生, 被害状況およびウイルス分離の経緯を述べ, 発病機構を明らかにする目的でヒラメを対象に病理組織学的な観察を行った。ついで第II章では我が国北方冷水域の重要な増養殖対象魚であるサケ科魚類, 特にサケ (*Oncorhynchus keta*), ニジマス (*O*. *mykiss*), サクラマス (*O*. *masou*), ギンザケ (*O*. *kisutch*) 及びカラフトマス (*O*. *gorbuscha*) を対象に HRV の病原性を検討し, HRV と同属のラブドウイルスである IHNV および VHSV 感染症と本症との相違を病理組織学的に比較検討した。第III章では HRV の増殖過程及び生成物を検討する目的で, まず培養細胞を用いて in vitro で本ウィルスの細胞内増殖過程を経時的に電子顕微鏡を用いて観察しこの結果を他の魚類病原ラブドウイルスの増殖過程と比較検討した。ついで in vitro での観察結果を基に発症魚を対象に HRV の in vivo での増殖の場を観察した。さらに第IV章では HRV 感染症の防除対策の確立を目的に飼

---

*西沢豊彦・吉水 守・木村喬久 : 魚類病原ウイルス HRV に関する研究 : ウイルス構造蛋白の他魚類病原ラブドウイルスとの比較. 昭和61年度日本水産学会春期大会

育環境水温が15℃を越えた場合自然終息する傾向がみられたことより，HRV 感染発症に及ぼす水温の影響を発症率，死亡率および血液学的性状の面から検討した。ついで HRV の各種消毒剤，紫外線に対する感受性を検討した。

本論文は自然発症ヒラメの病理組織，HRV のニジマスに対する強い病原性，HRV 感染細胞に見られる形態的特徴および飼育水温制御と紫外線や消毒剤による HRV の防除について報告する。

第Ⅰ章　ヒラメにおける HRV 感染症の発生状況および病理組織学的特徴

本章ではまず第1節において兵庫県，香川県および北海道におけるヒラメの HRV 感染症の発生経過，被害状況，ウイルス分離の経緯，分離ウイルスの性状等について検討した。次いで第2節では本ウイルス感染症の病理学的特徴を明らかにすることを目的に，兵庫県および北海道で発生した本症の病理組織学的検討を行なった。

第1節　HRV 感染症の発生経過および被害状況

1984年春に兵庫県下で飼育中のヒラメ病魚から分離されたウイルス HRV は，翌年には兵庫県，北海道および香川県で飼育中のヒラメ病魚からも分離され，本疾病による被害は三重県，岡山県と広がっていることが分かり（吉水ら 1987），現在本ウイルスによる養殖場における被害はヒラメのみならずクロダイにも及んでいる（安部ら 口頭発表*）。

本節では1984年から1985年にかけて兵庫県下のヒラメに発生した2例，および1985年の北海道および香川県下での発生例1例を対象にその発生経過，被害状況，病魚の観察結果をとりまとめるとともに，分離ウイルスについて1986年以降岡山県，三重県下のヒラメおよびクロダイ病魚から分離されたウイルスを含め理化学的，血清学的性状を検討した。

材料と方法

ヒラメ病魚の発生状況および被害状況調査：

兵庫県および香川県下の発生例につきヒラメの飼育水温，飼育状況および飼育群中における病魚の発生および病害の状況，被害量等を両県水産試験場の魚病相談室の調査資料および兵庫県水産試験場の飼育観察記録を基に，また北海道での発生例では業者の養殖日誌を基に被害状況の調査を行った。

病魚の検査法およびウイルスの分離：

---

*安部昌明・松本紀男・反町　稔：クロダイに発生した HRV 感染症と分離された HRV の各種海産魚に対する病原性，平成元年度日本魚病学会春期大会。

兵庫県淡路島，兵庫県水産試験場，香川県女木島およびで北海道焼尻島で飼育中のヒラメ病魚を供試し，症状を観察後，魚体重，体長を測定し，無菌的に開腹して腎臓，脾臓および生殖腺を対象に細菌検査およびウイルス検査を実施した。

細菌検査はトリプティケースソイ寒天（trypticase soy agar: TSA; Difco社）平板培地を用い，腎臓および脾臓試料を画線培養し，25℃で5日間観察した。ウイルス検査は腎臓と脾臓の混合試料および生殖腺をホモゲナイズ後，ミリポアフィルター HA（0.45 μm）で濾過除菌し，氷冷して実験室に運び RTG-2 に接種して，15℃で10日間観察した。CPE の観察された細胞培養液を濾過後再度 RTG-2 細胞に接種し，同様の CPE 出現を待ってウイルスを分離した。

なお RTG-2 細胞の培養には牛胎児血清（Gibco社）10%，ペニシリン100 I.U./ml，ストレプトマイシン100μg/mlを含む Eagle の最小必須栄養素培地（Minimam Essential Medium: MEM（以下同様）; Gibco社）にトリス緩衝液（最終濃度 tris-（Hydroxymethyl）-aminomethane-HCl 0.17%および tris-(Hydroxymethyl)- aminomethane 0.063%，pH7.8）を添加し，炭酸水素ナトリウム濃度を0.75%としたもの（以後 MEM_{10}-Tris と称す）を使用した。

供試ウイルスおよびその同定法：

1984年に兵庫県淡路島の養殖ヒラメ病魚から分離した 8401-H 株，1985年に兵庫県水産試験場のヒラメから分離した 8501-H 株，香川県下の養殖場のヒラメから分離した 8501-K 株および北海道のヒラメから分離した 8501-Y 株，さらに1986年に岡山県水産試験場の山本章造氏により同県下のヒラメから分離され同定依頼を受けた 8601-O 株，養殖研究所の反町稔博士により三重県下のヒラメおよび香川県下のクロダイから分離され，同定依頼を受けた 8601-M 株および BS8601-K 株の計7株を対象に以下の理化学的および血清学的性状により同定した。

理化学的性状検査：

1）エーテル感受性試験：供試ウイルス培養液（$10^7 TCID_{50}$/ml(50%tissue culture infectious dose)）をミリポアーフィルター HA（0.45μm）で濾過した培養濾液 4 mlに 1 mlのジエチルエーテル（特級，和光純薬社）を加え，4℃で18時間反応後，窒素ガス（純度99.9995%，日本酸素社）でエーテルを除去しウィルス感染価（$TCID_{50}$/ml）を測定した。対照には Hanks 液 (balanced salt solution; Gibco社）を用いた。対照の感染価に対し 1/100以下に感染価が減少した場合，エーテルに感受性ありと判定した。

2）酸（pH 3.0）感受性試験：塩酸を用いてpH 3.0に調整した MEM_{10}に供試ウイルス培養濾液を 1/10量加え10℃で3時間静置後，ウィルス感染価を測定した。対照にはpH 7.2の MEM_{10}-Tris を用いた。対照の感染価に対し 1/100以下に感染価が減少した場合，酸感受性ありと判定した。

3）熱安定性試験：供試ウイルス培養濾液をカーンチューブに0.5mlづつ分注し，各々を50℃および60℃のウォーターバスで1分から5分の間の所定時間加熱後，氷冷して各々のウィルス感染価を測定した。対照温度は15℃で行なった。

4) 5'ヨード 2'デオキシウリジン（IUdR 以下同様）による増殖阻害：RTG-2細胞に感染多重度（multiplicity of infection：m.o.i.（以下同様））= 0.01となるよう供試ウイルスを接種後，50 μg/ml の IUdR を含む MEM_{10} Tris で15℃10間培養し，培養上澄液のウィルス感染価を測定した。対照には IUdR の代わりに Hanks 液を用いた。対照の感染価に対し 1/100以下に感染価が減少した場合 IUdR による増殖阻害があると判定した。

HRV 感染 RTG-2 細胞の超薄切片作成：

HRV の代表株として 8401-H 株を供試し，25㎠容組織培養用フラスコで単層培養した RTG-2 細胞にm.o.i.＝0.1となるよう HRV を接種し，15℃で24時間培養後パラフォルム・グルタールアルデヒド混合液で 4 ℃ 2 時間固定した。ついで0.1Mカコジレートバッファーで洗浄後 2％オスミック酸で 4 ℃で 1 時間固定した。アルコールで脱水後エポン（Epok 812，応研社）で包埋した。このブロックをウルトラミクロトームで薄切し，酢酸ウラン，クエン酸鉛で染色して超薄切片を作成した。観察は電子顕微鏡（日立社 H-300型）を用い75kvで行なった。

抗HRV家兎血清の作製：

10^7TCID_{50}/ml の 8401-H 株 1 ml を抗原としてフロイント不完全アジュバント（Difco社）を用い家兎の耳の静脈中に週 1 回ずつ計 4 回の抗原接種を行い 1 週間後中和抗体の産生を確認した後，採血を行ない血清を分離し常法に従って非動化して抗血清とした。

抗血清による中和試験：

抗血清としては上述の抗 8401 H 株家兎血清，水産庁研究部から配布された抗 IHNV（HV-1）家兎血清およびフランス国立水産研究所 P. De Kinkelin 博士から分与を受けた抗 VHSV（polyvalent）家兎血清を供試した。まず Hanks 液で各抗血清の中和抗体価（50％ neutralization dose，ND_{50}）が 1 ：100となるよう希釈し，次いで $200TCID_{50}/50\ \mu l$ となるよう調製した供試ウィルス液に等量の各抗血清を加え15℃で30分間反応させた。反応後のウイルス液を予め96穴マイクロタイタープレイト中に15℃，24時間培養しておいた RTG-2 細胞に50 μl/穴ごと 4 穴に接種し CPE 出現の有無を観察した。

結　　果

病害の発生経過および被害状況：

兵庫県下では，1984年 3 月に淡路島で海面小割生簀で養殖中のヒラメに原因不明の疾病が発生し，さらに翌年 1 月同様の疾病が兵庫県水産試験場内で飼育中のヒラメにも発生した。これらのヒラメ病魚の外部症状および解剖所見は共に体表や鰭にスレ様の充出血，腹部膨満，腹水の貯留，生殖腺のうっ血，肝臓の充出血，腸管の発赤，筋肉内の充出血等であった。

発病時期は前者が 3 月下旬から 4 月下旬，後者では 1 月中旬から 3 月であり，発病水温は 6 ℃～ 8 ℃，終息時の水温は18℃前後であった。発病したヒラメの体重は100～300g，被害量は淡路島の場合，発病時の最大日間死亡率が約 1 ％，累積死亡率は25％，水産試験場での累積死亡率は7.2％であった。

香川県女木島では1985年 2 月下旬から 4 月にかけて，陸上の円形タ一ポリン水槽で養殖中の

Table 1. Outline of HRV disease outbreakes of cultured hirame in Hyogo, Kagawa and Hokkaido Prefectures, 1984 and 1985.

Place	Year	Water temp. (℃)	Body weight (g)	Cumulative mortality (%)	Signs of disease
Hyogo Pref. (Awaji Island)	1984	6～18℃	250～300	25	Hemorrhage in the muscle and fins Congestion of the gonads Accumulation of ascitic fluid
Hyogo Pref. (H.P.F.E.S.*)	1985	8～10℃	100～250	7.2	Hemorrhage in the muscle and fins Congestion of the gonads Accumulation of ascitic fluid
Kagawa Pref. (Megi Island)	1985	8～16℃	300～700	3.3	Hemorrhage in the muscle and fins Congestion of the gonads Accumulation of ascitic fluid
Hokkaido (Yagishiri Island)	1985	2～12℃	110～200	92	Hemorrhage in the muscle Congestion of the gonads (Accumulation of ascitic fluid)

* : Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station.

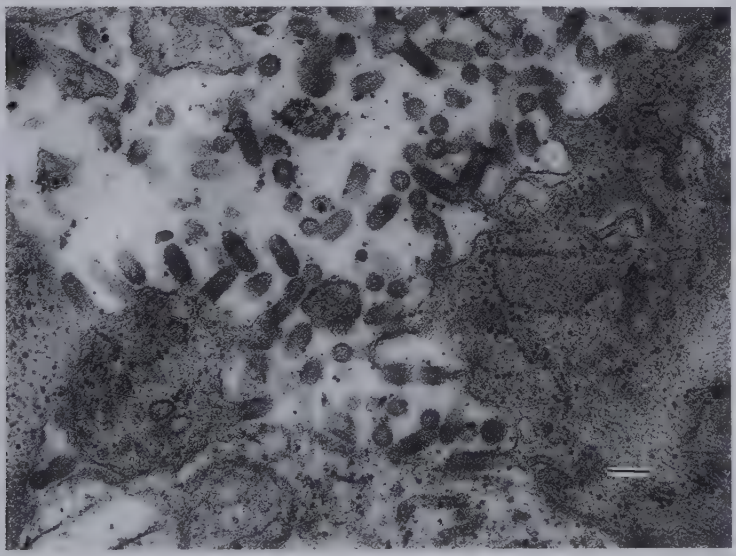


Fig. 1. Ultramicroscopical form of hirame rhabdovirus (*Rhabdovirus olivaceus*) isolated from hirame in Hyogo Prefecture (bar=200nm).

ヒラメに体表面の充出血，腹水の貯留，生殖腺のうっ血，筋肉内の出血を主徴とする疾病が発生した。罹病魚の体重は300～700g，水温の低い２月下旬より病魚が見られ始め５月上旬に終息したが，発病時の水温は８～16℃，累積死亡率は3.3%（約500尾）であった。

北海道でも1985年２～４月にかけて焼尻島のヒラメ養殖場で陸上水槽にて飼育中のヒラメに

Table 2. Results of viral and bacterial examination of moribund hirame cultured in Hyogo, Kagawa and Hokkaido Prefectures.

Sampling		Fish No.	Body weight (g)	Body length (cm)	Isolation of			
					bacteria		virus	
place	date				Kd*1	Sp*1	Kd+Sp*1	Gonad
Hyogo Pref. (Awaji Island)	April 5 1984	1	205	17.0	−	−	+	+
		2	236	26.5	−	−	+	+
		3	235	27.0	−	−	+	+
		4	250	18.0	−	−	+	+
		5	250	29.0	−	−	+	+
Hyogo Pref. (H.P.F.E.S.*2)	January 16～ February 8 1985	1	262	22.2	−	−	+	+
		2	223	12.5	−	−	+	+
		3	248	17.0	−	−	+	+
		4	242	18.0	−	−	+	+
		5	275	23.0	−	−	+	+
Kagawa Pref. (Megi Island)	April 9 1985	1	275	36.0	−	−	+	+
		2	280	46.0	−	−	+	+
		3	264	33.0	−	−	+	+
		4	290	47.0	−	−	+	+
Hokkaido (Yagishiri Island)	April 11 1985	1	195	26.2	−	−	+	+
		2	195	25.9	−	−	+	+
		3	131	22.4	−	−	+	+
		4	170	22.4	−	−	+	+
		5	116	21.7	−	−	+	+

*1 : Kd=Kidney, Sp=Spleen, Kd+Sp=Kidney and spleen mixture.
*2 : Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station.
*3 : Infected with *Flexibacter* sp.

腹水貯留，生殖腺のうっ血，筋肉内の出血を主徴とする疾病が発生した。この地方で一年のうちで水温が最も低くなる２月から病魚が見られ始め，４月までにほとんどの魚が死亡した。この時の水温は２月で２℃，４月で８℃であった。病魚の体重は110～200g，本症による死亡数は３月から４月にかけて最も多く４月初旬の10日間で7500尾（養殖開始時の約60％）が死亡し，本症が終息した４月下旬の累積死亡率は92％に達した。以上の発症例の概要をTable 1に示した。

ウイルス分離：

兵庫県淡路島および兵庫県水産試験場の病魚では５尾中５尾から，また香川県水産試験場の病魚でも４尾中４尾から，さらに北海道の焼尻島の病魚では，検査した５尾中４尾からRTG-２細胞にIHNV様のCPEを形成するウイルスが分離された（Table 2）。なおいずれの試料からも特定の細菌は分離されなかった。

分離ウイルスの性状：

1984年に最初にヒラメ病魚から分離した8401-H株を含む供試ウイルス８株の性状をTable

Table 3. Characteristics of virus strains isolated from moribund hirame cultured in Hyogo, Kagawa, Hokkaido, Okayama and Mie Prefectures during 1984 to 1986.

Virus strain	Ether treatment 4℃ 18h	pH3.0 15℃ 3h	Heating 50℃ 2 min	Heating 60℃ 1 min	IUdR 50μg/ml	Neutralization*1 antisera against HRV	IHNV	VHSV
8401-H	Sensitive	Sensitive	—*2	—	—*3	Yes	No	No
8501-H	〃	〃	—	—	—	〃	〃	〃
8501-K	〃	〃	—	—	—	〃	〃	〃
8501-Y	〃	〃	—	—	—	〃	〃	〃
8601-O	〃	〃	—	—	—	〃	〃	〃
8601-M	〃	〃	—	—	—	〃	〃	〃
BS8601-K	〃	〃	—	—	—	〃	〃	〃

*1 : Neutralization test by anti HRV (8401-H), IHNV and VHSV rabbit sera.
*2 : Heat stability. *3 : Inhibit.

3に示した。供試株はいずれもエーテル，酸（pH3.0）に感受性を有し，IUdR（50μg/ml）存在下でも増殖は阻害されず，50℃では2分間あるいは60℃で1分間の加熱処理により完全に失活し易熱性であった。8401-H株感染RTG-2細胞で観察されたウイルス粒子は砲弾型を呈し，大きさは80×160～180nmであった（Fig. 1）。また供試ウイルスはいずれも抗HRV（8401-H）家兎血清により中和されたが，IHNVおよびVHSVに対する抗血清では中和されなかった。

考　　察

HRV自然感染の被害状況をまとめた結果，いずれの場合でも水温が15℃前後まで上昇すると自然終息する傾向がみられている。したがって本症の発生は春先の飼育水温が低い時期に限られ，特に飼育水温が著しく低い北海道では被害量も大きい。また水温が高くなる時期に終息が見られたことから本病の感染発症には水温の影響が示唆された。また本病罹病ヒラメの体重は兵庫県，北海道および香川県の場合，それぞれ100～300g，110～200gおよび300～700gと出荷サイズのヒラメにまで感染・発病することが明らかになり経済的にも大きな損失となった。

一方，病魚の腎臓，脾臓および生殖腺からいずれもRTG 2細胞にIHNVと類似のCPEを発現するウイルスが分離された。1984年兵庫県淡路島のヒラメ病魚から分離されたウイルスをはじめ，1985年に兵庫県水産試験場，北海道焼尻島および香川県女木島のヒラメ病魚から分離されたウイルス，さらに1986年に岡山県および三重県下の養殖ヒラメ稚魚ならびに香川県下の養殖クロダイから分離されたウイルスはいずれもIUdRによる増殖阻害は認められず，エーテル，酸（pH 3）に感受性を示し，電顕観察では80×160～180nmの砲弾型を呈してラブドウイルスの特徴を示し，いずれも抗HRV血清により中和されHRVと同定された。

HRVのヒラメに対する病原性については五利江・中本（1986）が体重95～265gのヒラメにHRVを10^6TCID$_{50}$/尾宛腹腔内に接種して10℃で飼育し，累積死亡率は20%であったと報告している。また反町（1987）は体重98～203gのヒラメに$10^{6.1}$TCID$_{50}$/尾宛腹腔内に接種し12℃で飼育した場合，その累積死亡率は67%に達したと報告している。さらに吉水ら（1987）がクロダイ

(*Mylio macrocephalus*) から，SANO and FUKUDA (1987) がメバル (*Sebastes inermis*) から HRV を分離し，反町 (1987) がマダイおよびクロダイで，安部ら (口頭発表*) がクロダイ，キジハタ (*Epinephelus akaara*)，クジメ (*Hexagrammos agrammus*)，マハゼ (*Acanthogobius flavimanus*) およびアサヒアナハゼ (*Pseudblennius cottoides*) に対し HRV が病原性を有することを報告し，HRV はヒラメのみならず多くの海産魚に病原性を有していることが明らかとなり，その被害の拡大が危惧される。したがって今後早急に HRV の伝播および感染防除策を確立する必要があると考える。

第 2 節　HRV自然発症ヒラメの病理組織像

HRV 感染症の診断および感染防除対策を確立するに際し，その基礎的知見としての病理組織学的所見が重要であると考え，本節では兵庫県下および北海道で発生した HRV 自然発病ヒラメ病魚を対象に各臓器の病理組織像を観察した。

材 料 と 方 法

供試魚および供試組織

1984年 3 月，兵庫県下の養殖場で発病した10ヵ月齢のヒラメ病魚 5 尾 (体重約100～300g) の生殖腺，1985年 1 月から 2 月にかけて兵庫県水産試験場において自然発病したヒラメ病魚 5 尾 (8 ヵ月齢，体長22.5～26.2cm，体重111～230g) ならびに1985年 4 月に北海道焼尻島の養殖場で自然発病したヒラメ病魚 7 尾 (体長21.5～23.5cm，体重110～210g) の腎臓，脾臓，筋肉，生殖腺，肝臓，消化管を供試した。対照には1985年 6 月北海道立栽培漁業総合センターで飼育中の健康なヒラメ 3 尾 (体長約15cm，体重約90g) の各臓器を用いた。供試魚と供試臓器の一覧は Table 4 に示したが，対照以外の供試魚からはHRVが分離されている。

病理組織標本作製法

瀕死の供試魚を飼育槽より取り上げ，直ちにそれぞれの臓器を摘出し，ブアン氏液 (飽和ピクリン酸水溶液，ホルマリン原液，酢酸の混合比25：5：1) で 1～2 日間固定後，80，90，95，100%エチルアルコールで順次脱水し，キシレンを浸透後ヒストパラフィン (和光科学社) で包埋した。ついでパラフィンブロックを厚さ 4 μmの切片に薄切し，ヘマトキシレン・エオシン (H-E) の 2 重染色を施した後，脱水・カバーグラスによる封入を行い，光学顕微鏡を用いて観察した。

結　　果

腎臓：

---

* 安部昌明・松本紀男・反町　稔：クロダイに発生した HRV 感染症と分離された HRV の各種海産魚に対する病原性，平成元年度日本魚病学会春期大会。
安部昌明・松本紀男・宮崎照雄：クロダイの HRV 感染症に関する研究，自然発病魚と実験感染魚の病理組織，平成元年度日本魚病学会秋期大会。

Table 4. List of the specimens of HRV infected hirame employed for histopathological examination.

Sampling		Condition	Organ					
date	place	of fishes	Kidney	Spleen	Muscle	Gonad	Liver	Gut
Mar.30'84	Private Fish	D *3				0 *5		
30'84	Farm in	D				0		
Apr. 4'84	Hyogo Pref.	D				0		
5'84		D				0		
5'84		D				0		
Jan.16'85	Hyogo	D	0	0	0	0	0	0
17'85	P.F.E.S. *1	D	0	0	0		0	
23'85		D	0	0	0		0	
Feb. 5'85		D	0	0		0	0	
8'85		D	0	0		0	0	0
Apr.11'85	Yagishiri	D	0	0	0	0	0	
11'85	Island in	D	0	0	0	0	0	
11'85	Hokkaido	D	0	0	0	0	0	
11'85		D	0	0	0	0	0	0
11'85		D	0	0	0	0	0	
11'85		D	0	0	0	0	0	0
11'85		D	0	0	0	0	0	0
Jun. 7'85	Hokkaido	H *4	0	0	0		0	0
7'85	M.C.C. *2	H	0	0	0		0	0
7'85		H	0	0	0		0	0

*1 : Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station.
*2 : Marine Cultivation Center.
*3 : Diseased fish (Natural outbreak).
*4 : Healthy fish (Control).
*5 : Employed for histology.

正常魚の腎臓を Plate 1 , Figs. 1 , 2 に示した。硬骨魚類の腎臓は尿細管，ボーマン嚢とその間質の造血組織で構成されているが，兵庫県水産試験場の自然発病ヒラメでは，造血組織の各所に著しい出血像が観察され，さらに組織全体に瀰慢的な壊死がみられ，著しい融解壊死巣も認められた (Plate 1 , Fig. 3)。この病変は出血部に隣接した場所に多く認められた。こうした病巣では核の濃縮，消失あるいは膨化といった核の退行像が見られ，塩基性色素による染色性が悪く，細胞が崩壊して融解するとともに繊維素の沈着も起こっていた。またこの壊死病巣に巻き込まれた尿細管上皮も壊死崩壊していることが多かった。また黒色大食細胞集塊部の色素沈着は少なく，褐色色素小顆粒が組織中に散在していた (Plate 1 , Fig. 4)。

北海道焼尻島の自然発症魚でも兵庫県水産試験場のヒラメと同様の所見が得られたが，出血部において血液が網状組織内に浸潤せず，血球が密に詰まった組織像を示した個体も存在した (Plate 1 , Figs. 5 , 6)。

脾臓：

対照魚の正常な脾臓の組織像を Plate 2 , Figs. 7 , 8 に示した。兵庫県水産試験場の自然発症

魚の脾臓には全体に著しい出血および壊死巣が観察され，特に脾髄には著しい巣状壊死および瀰慢的な壊死が起こっていた（Plate 2，Fig. 9）。この巣状壊死域では核の濃縮，消失を伴う退行像が認められ，細胞質の崩壊または融解が観察された。さらに著しい出血に加え出血辺縁部に繊維素の沈着がみられた。また瀰慢的な壊死局所でも壊死細胞の崩壊に加えて出血，水腫と繊維素の沈着を起こしていた。英動脈や英組織の細胞も顕著に変性し，この変性細胞が多数の小塊を形成して脾髄組織中に散在していた。一方，一部の中心動脈の周囲には壊死崩壊の見られない細網細胞の集団が認められた（Plate 2，Fig.10）。焼尻島の病魚でも出血像が観察されたが，兵庫県水産試験場の自然発症魚に比べればその程度は軽度であった。脾髄に著しい巣状壊死はみられなかったが，細網細胞の核濃縮，核消失を伴う壊死が広範囲に起こり，核の膨潤も若干観察された。特に動脈やその周囲の組織，リンパ様組織において細胞は核消失を伴う融解壊死を起こしていた。この壊死部は，水腫と繊維素の沈着を伴い脾髄組織中で小塊として分画されていた。また中心動脈にも著しい壊死が観察された（Plate 2，Figs.11，12）。

体側筋：

対照魚の体側筋では，筋組織の毛細血管は極めて細かったが（Plate 3，Figs.13，14），兵庫県水産試験場の自然発症魚では筋組織中の毛細血管は充血していた。さらに毛細血管末端の筋組織間質に異常な数の赤血球がみられる出血像が観察された（Plate 3，Fig.15）。この部位の毛細血管壁には細胞の崩壊像が観察され，これが出血の原因と考えられた（Plate 3，Fig.16）。北海道焼尻島の病魚の筋肉で同様の毛細血管の充血・怒張およびその端部における出血が観察された（Plate 3，Figs.17，18）。

精巣：

対照魚の精巣を Plate 4，Figs.19，20に示した。兵庫県下の養殖場の自然発症魚では精巣小葉中隔及び精細管間質に充血から出血に至る循環障害が観察された（Plate 4，Fig.21）。個体差が見られたが精細管間質での出血の程度が著しい個体では，特に精巣辺縁部の出血が顕著で，精細胞や支持細胞は壊死に陥いり，間質を構成する繊維芽細胞等が消失していた（Plate 4，Fig.22）。精巣中心部では精間質の充血が顕著で血栓状を呈していたが，精細管の精上皮の壊死はみられなかった。さらに精巣の輸精管や精管の結合織にも充血および出血が観察された。北海道焼尻島の病魚でも間質に充血像が認められ（Plate 4，Figs.23，24），輸精管や精管の結合織に顕著な出血像が観察された。

卵巣：

対照魚の卵巣を Plate 5，Figs.25，26に示した。兵庫県下の養殖場の自然発症魚では，卵巣薄板の間質中の毛細血管が充血・怒張し，卵巣腔に沿った毛細血管末端部には顕著な出血像が観察された（Plate 5，Figs.27，28）。さらに間質中の毛細血管周囲の繊維芽細胞には，核の肥大や核濃縮が起こり壊死が認められ（Plate 5，Fig.28），輸卵管の粘膜下結合組織にも充血や出血が起こっていた。また北海道焼尻島の病魚も兵庫県下の養殖場の自然発症魚とほぼ同様な病理組織像を示した（Plate 5，Figs.29，30）。

肝臓：

正常魚の肝臓を Plate 6 , Figs.31, 32 に示した。肝臓内の膵臓組織については後に詳述するが兵庫県水産試験場の自然発症魚の肝臓には，前述した他の組織中の毛細血管に観察されたような著しい充血や出血像は認められず，肝実質細胞にも異常増生や壊死巣はむろん，核や細胞質にも顕著な病変は観察されなかった（Plate 6 , Fig.33, 34)。北海道焼尻島の病魚の肝臓は，兵庫の発病魚と同様肝臓内に局所的な壊死巣や増生像は観察されなかった（Plate 6 , Fig.35. 36)。

膵臓：

対照魚の膵臓を Plate 7 , Figs.37, 38に示した。兵庫県下の養魚場の自然発症魚では，個体によっては外分泌部の腺細胞が多数集合した複合胞状腺の中心にある肝門脈に充血がみられ，腺細胞の核が膨潤して空胞変性を起こしているものや，核濃縮が一部に認められるものも観察された場合もあったが，膵臓外分泌部に顕著な病変は観察されなかった。(Plate 7 , Figs.39, 40)。一方北海道焼尻島の病魚では顕著な病変は観察されなかった（Plate 7 , Figs.41, 42)。

消化管：

対照魚の消化管を Plate 8 , Figs.43, 44に示した。兵庫水産試験場の自然発症魚のうち症状の著しい個体では，消化管の粘膜固有層，粘膜下組織および筋層内の血管が顕著に充血・怒張し，組織内には著しい出血像が観察された。また粘膜固有層や粘膜下組織の疎性結合組織には細胞変性が起き，粘膜上皮組織中にも激しい出血が観察された。胃では粘膜上皮の出血は顕著でなかったが，腸管同様粘膜固有層や粘膜下組織，筋層中の著しい血管の充血，出血，細胞変性が認められた（Plate 8 , Figs.45, 46)。北海道焼尻島の病魚の腸管および胃の標本にも兵庫県水産試験場の自然発症魚とほぼ同様の所見が得らた。また，これら消化管の粘膜固有層および粘膜下組織中の充血や出血は，特に消化管壁側面で著しかった（Plate 8 , Figs.47, 48)。

考　　察

HRV の病理組織学的特徴として，北海道と兵庫県下の自然発症魚では共に腎臓の造血組織に核濃縮，核消失，核膨化といった核の退行を伴う壊死や組織内での著しい出血が挙げられ，脾臓でも脾髄組織に著しい核変性を伴う壊死や，組織内の出血が見られた。さらに体側筋繊維間に血管の充血による怒張や毛細血管の出血，精巣，卵巣の間質組織中にみられる出血，消化管の粘膜層および筋層中の出血さらには充血といった魚体内各組織に認められる充血，出血像が観察された。肝臓には著しい壊死および出血は観察されなかった。以上各組織の病理組織学的検討結果をとりまとめて Table 5 に示した。

HRV は既知魚類ラブドウイルスの中では IHNV や VHSV に分類学上近縁である（西沢ら口頭発表)。そのうち IHNV 感染症は造血組織の著しい壊死を主徴とし，消化管の壊死，特に粘膜層中の好酸性顆粒細胞 (eosinophilic granular cell) の変性が著しい。また，肝臓内の肝実質細胞に核の膨化を伴う融解壊死が明瞭に観察され，広範囲な融解壊死巣を形成する場合もあり，肝門脈，肝静脈の血管壁，胆管周囲の結合織の壊死が観察されている（Yasutake and Rasmussen 1968, Amend *et al*. 1968 , Amend and Chamabers 1970, Yasutake and

Table 5. Histopathological findings of HRV infected hirame.

Sampling place	Condition of fishes	Organ					
		Kidney	Spleen	Muscle	Gonad	Liver	Gut
Hyogo P.F.E.S.*1	D*2 (Natural outbreak)	necrosis	necrosis	hyperemia	hyperemia	normal?	hemorrhage hyperemia
Private Fish Farm in Hyogo Pref.	D (Natural outbreak)	NT*3	NT	NT	hemorrhage hyperemia	NT	NT
Yagishri Island in Hokkaido	D (Natural outbreak)	necrosis	necrosis	hyperemia	hemorrhage hyperemia	normal?	hemorrhage

*1 : Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station.
*2 : Diseased fish.
*3, NT: Not tested.

AMEND 1972, CARLISLE *et al*.1979)。一方，VHSV 感染症では激しい出血像を示し，急性型では肝臓全域にわたる肝実質細胞の瀰慢的壊死が観察され，著しい壊死巣を形成し，細胞質の好酸性化，核内の染色質の核壁側への遍在，核濃縮，核崩壊，壊死巣周縁の水腫等が観察されている（GHITTINO 1965, AMLACHER *et al*. 1980, DE KINKELIN and CASTRIC 1982)。HRV 感染症を含むこれら3者に共通した主な症状は体色の黒化，異常遊泳，腹水の貯留，筋肉中および鰭基部の出血であり，病理組織学的には，腎臓の造血組織の壊死，脾臓の脾髄組織中の細網細胞の核濃縮，核崩壊，核融解を伴う壊死であった。相違点としては IHNV や VHSV 感染症ではニジマスの肝臓に著しい変化が観察されているが，HRV 感染症ではヒラメの肝臓にこのような変化はみられなかった。HRV 感染症は脂肪組織，鰾，腸管等魚体内各組織に著しい充血，出血を伴う出血性の敗血症をひき起こし，特に軀幹筋の出血が顕著であった点 VHSV 感染症（GHITTINO 1965, BELLET 1965）に類似していた。また IHNV 感染症では消化管の壊死が顕著であり，特に消化管粘膜中の好酸性顆粒細胞（ECG）の変性が著しいとされているが（YASUTAKE 1970)，ヒラメではニジマスの消化管に観察される好酸性顆粒細胞が存在しないためにこの点に関しては比較できなかった。

また最近 VHSV は海産魚のシーバスやターボットにも病原性を有することが人工感染試験により確かめられている（CASTRIC and DE KINKERIN 1984)。その症状はターボットの場合，体色の若干の黒化，頭部の出血による赤色化，眼球および鰭の出血等であり，解剖所見では腹水の貯留と肝臓及び腹腔壁の出血が報告され，病理組織学的には，腎臓の造血組織および脾臓の脾髄組織の壊死，肝臓では数個体に出血と壊死が観察されている。これらの症状および組織変化はヒラメの HRV 感染症の症状および病理組織像と共通する点が多く，今後 VHSV 感染症とのより詳細な比較検討を行う必要があると考える。

第Ⅱ章　HRV のサケ科魚類に対する病原性およびその病理組織像

前章では HRV 自然発症ヒラメの魚病理組織学的特徴が HRV と分類学上近縁であるサケ科魚類病原ウイルスの IHNV や VHSV 感染症の病理組織像が類似していることを明らかにした。

そこで本章では第1節で我国北方冷水域における重要な増養殖対象魚類であるサケ科魚類のサケ，ニジマス，ギンザケ，サクラマス，カラフトマスを対象に人工感染試験により HRV の病原性を検討し，第2節では HRV に高い感受性を示したニジマスを対象に HRV 接種量と供試魚の魚体重の感染発症に及ぼす影響を検討し，HRV のニジマスに対する病原性を IHNV のそれと比較検討した。さらに第3節では HRV 感染ニジマスの病理組織像を観察して IHNV 感染魚と病理組織学的に比較検討した。

第1節　HRV のサケ科魚類に対する病原性

本節では我が国北方冷水域における重要な増養殖対象魚種であるサケ，サクラマス，ニジマス，ギンザケ，カラフトマスを対象に人工感染試験による HRV のこれらの魚種に対する病原性を検討した。

材料と方法

供試魚

人工感染試験のうち浸漬感染試験には北海道大学水産学部微生物学講座実験室で脱塩素処理水道水を用いて孵化・飼育した1カ月齢のニジマス；平均体長3.2cm，平均魚体重0.2g，ギンザケ；平均体長3.8cm，平均体重0.3g，サケ；平均体長4.2cm，平均体重0.4g，カラフトマス；平均体長4.1cm，平均体重0.3g，各50尾を用いた。腹腔内接種試験には同様に飼育した3カ月齢のニジマス；平均体長4.0cm，平均体重0.5g，ギンザケ；平均体長4.2cm，平均体重0.5g，サケ；平均体長4.8cm，平均体重0.6g，サクラマス；平均体長4.0cm，平均体重0.5gの各20尾を供試した。

供試ウイルス

供試ウイルスとしては HRV の 8401 H 株を用い，RTG-2 細胞で15℃ 1週間培養後，バイアルチューブに分注し，試験に供するまで−80℃にストックした。なお細胞の培養には MEM_{10} を使用した。人工感染試験使用時のウイルス保存液の感染価は $10^{6.3}TCID_{50}/ml$ であった。

人工感染試験方法

浸漬感染試験は3 l 容水槽を用い HRV を $10^{2.30}TCID_{50}/ml$ 含む脱塩素処理水道水に供試魚を12℃60分間漬浸した後，水温12～14℃の脱塩素処理水道水を用いて15日間流水飼育した。腹腔内接種感染試験では供試魚を麻酔剤 MS 222（三共社）200ppmで2～5分間麻酔後，腹部を消

毒し，供試ウイルス液を1尾あたり50μl，すなわち$10^{4.0}$TCID$_{50}$/尾宛腹腔内に接種した。以後漬浸感染試験同様、流水で50日間飼育した。なおこれらの各群にはHRV培養液の代わりにMEM$_{10}$を用いた対照区を設け同数の供試魚を収容し同一条件で飼育した。

魚体内ウィルス量の測定法

各群の観察期間中，経日的に死亡尾数を計数し，死亡魚および観察期間終了時の生残魚を，水槽より取り上げた後，直ちに開腹し腎臓・脾臓を摘出し，10倍量のHanks液を加え，ストマッカー（Colworth-Type 80）を用いてホモジナイズし，ミリポアフィルターHA（0.45μm）で濾過して，ウイルス検査試料とした。ウィルス感染価の測定はRTG-2細胞を用い，常法の96穴マイクロプレート各4穴を用いる方法によりTCID$_{50}$/gとして測定した。

結　　果

Table 6. Result of virus isolation from artificially infected rainbow trout, coho salmon, chum salmon and pink salmon with HRV by immersion method.

Fish species	Fish			Virus titer (log TCID$_{50}$/g)
	No.	Days p.i.*1	condition	
Rainbow trout	1	8	D*2	3.55
	2	8	D	5.30
	3	9	D	5.30
	4	12	D	2.80
	5	15	S*3	5.80
	6	15	S	5.80
	7	15	S	≦1.80
	8	15	S	≦1.80
	9	15	S	≦1.80
Coho salmon	1	2	D	≦1.80
	2	10	D	≦1.80
	3	15	S	≦1.80
	4	15	S	≦1.80
	5	15	S	≦1.80
	6	15	S	≦1.80
	7	15	S	≦1.80
Chum salmon	1	12	D	≦1.80
	2	14	D	≦1.80
	3	15	S	≦1.80
	4	15	S	≦1.80
	5	15	S	≦1.80
	6	15	S	≦1.80
	7	15	S	≦1.80
Pink salmon	1	5	D	≦1.80
	2	15	S	≦1.80
	3	15	S	≦1.80
	4	15	S	≦1.80
	5	15	S	≦1.80
	6	15	S	≦1.80

*1, p.i.: post-infection. *2, D: Died fish. *3, S: Survived fish.

浸漬感染試験

各実験群ともに顕著な死亡は見られず，観察期間終了時の累積死亡率はニジマス８％，ギンザケ４％，サケ４％，カラフトマス０％であり，ニジマスの対照群が若干高い価を示したが，いずれの試験群も対照群と比べほとんど差は認められず，死亡した個体に特徴的な症状は認め

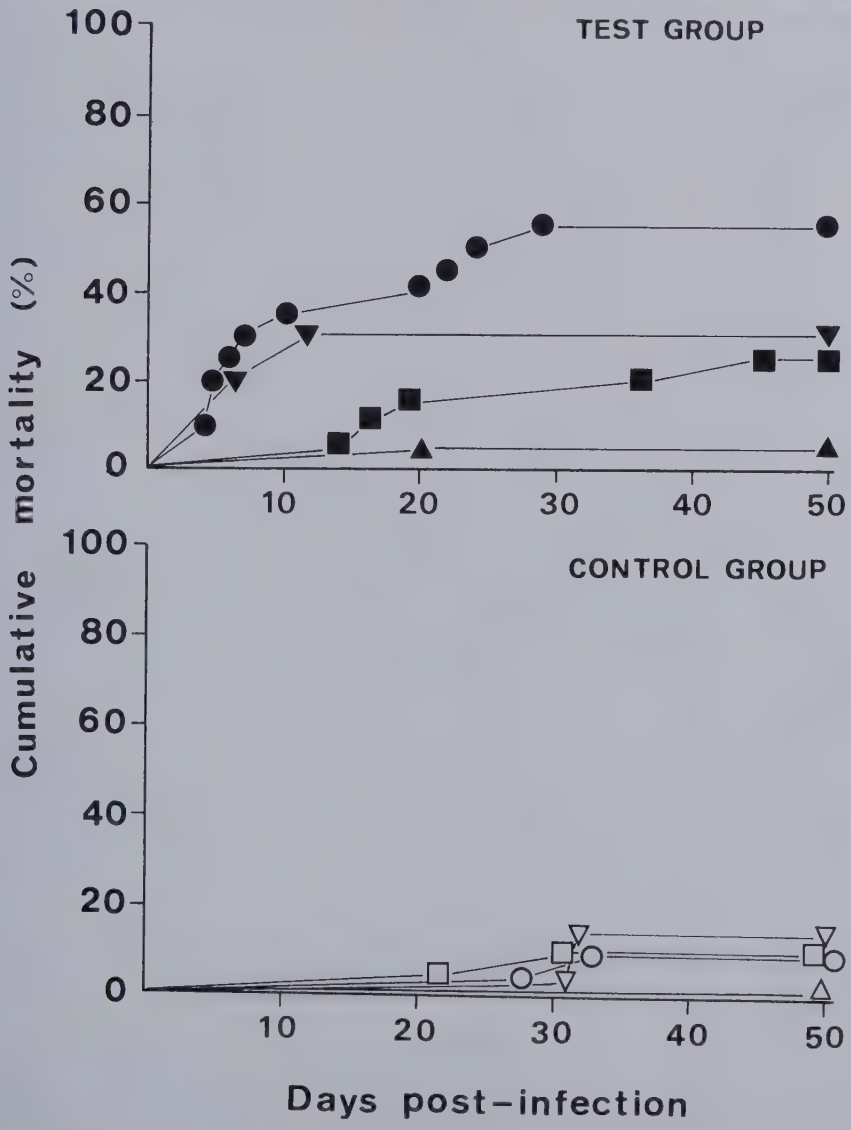


Fig. 2. Comparison of cumulative mortality among rainbow trout, coho salmon, chum salmon and masu salmon infected with HRV by intraperitoneal injection (dose : $10^{4.00}$ $TCID_{50}$/fish).
○△□▽ : Control group. ●▲■▼ : Test group.
○,● : rainbow trout. △,▲ : coho salmon. □,■ : chum salmon. ▽,▼: masu salmon.

られなかった。ウィルス検査の結果ではニジマスの死亡魚全てと生残魚の一部からウィルスが分離され，それぞれの最大ウイルス感染価は$10^{5.30}$，$10^{5.80}$TCID$_{50}$/gと比較的高い価を示す個体が認められた（Table 6）。一方，対照魚全てとギンザケ・サケ・カラフトマスの死亡魚および生残魚からはウィルスは分離されなかった。

腹腔内接種感染試験

HRV の腹腔内接種攻撃法による累積死亡率をFig. 2に示した。ニジマスでは 4 日目から死亡が観察され始め11日目までに35%の累積死亡率を示し，29日目に55%に達したが，以後30日目からは死亡は認められなくなった。死亡したニジマスは，体色黒化，眼球突出，腹水貯留，腎臓・脾臓の出血が認められ，筋肉内に顕著な出血がみられた（Plate 9 , Fig. 49）。特に頭腎背側の筋肉内に激しい出血が特徴的に観察された。サクラマスの累積死亡率は 6 日目に20%，12日目に30%に達したが，以後死亡は見られなくなった。6 日目に死亡したサクラマスには，ニジマスで観察された症状と同様な眼球の突出，筋肉中の顕著な出血，腹水貯留などが認められた（Plate 9 , Fig. 50）。サケは漸次 1 尾ずつ死亡し観察終了時には25%の累積死亡率を示したが，死亡魚には症状はみられず，またギンザケでは死亡率 5 %で症状は認められなかった。ウイルス検査の結果をTable 7 に示したが，ニジマス，サクラマスの死亡魚からはウイルスが分離され，ニジマスでは$10^{2.55}$～$10^{5.55}$TCID$_{50}$/g，サクラマスでは$10^{2.55}$～$10^{4.55}$TCID$_{50}$/gの感染価を示し，全体的にサクラマスよりもニジマスの方が高い感染価を示した。しかしギンザケおよびサ

Table 7. Result of virus isolation from artificially infected rainbow trout, coho salmon, chum salmon and masu salmon with HRV by intraperitoneal injection.

Fish species	Fish No.	Days p.i.*1	condition	Virus titer (log TCID$_{50}$/g)
Rainbow Trout	1	4	D*2	2.55
	2	5	D	3.30
	3	5	D	5.55
	4	6	D	3.55
	5	7	D	4.30
	6	11	D	2.80
	7	20	D	5.30
	8	22	D	5.55
	9	24	D	4.05
	10	29	D	4.80
	11	50	S*3	≦1.80
	12	50	S	≦1.80
	13	50	S	≦1.80
	14	50	S	≦1.80
	15	50	S	≦1.80
Coho salmon	1	29	D	≦1.80
	2	50	S	≦1.80
	3	50	S	≦1.80
	4	50	S	≦1.80
	5	50	S	≦1.80
	6	50	S	≦1.80
Chum salmon	1	14	D	≦1.80
	2	16	D	≦1.80
	3	19	D	≦1.80
	4	36	D	≦1.80
	5	45	D	≦1.80
	6	50	S	≦1.80
	7	50	S	≦1.80
	8	50	S	≦1.80
	9	50	S	≦1.80
	10	50	S	≦1.80
Masu salmon	1	6	D	4.05
	2	6	D	3.80
	3	6	D	4.55
	4	6	D	2.55
	5	12	D	2.80
	6	12	D	3.05
	7	50	S	≦1.80
	8	50	S	≦1.80
	9	50	S	≦1.80
	10	50	S	≦1.80

*1, p.i.: post-infection. *2, D: Died fish. *3, S: Survived fish.

ケからは HRV は分離されなかった。

考　　察

IHNV の宿主域としてはマスノスケ（*O. tschawytscha*）（Ross *et al*. 1960），ベニザケ（*O. nerka*）（Rucker *et al*. 1953），ニジマス（Amend *et al*. 1969），大西洋サケ（*Salmo sala*）（Mulcahy and Wood 1986），ヤマメ（*O. masou*）・ヒメマス（*O. nerka*）（Kimura *et al*. 1977）等が知られ，VHSV ではニジマス（Ghittino 1965, 1973），ブラウンマス（*S. trutta*）・カワマス（*Salvelinus fontinalis*）（Tack 1959, Rasmussen 1965），大西洋サケ（De Kinkelin and Castric 1982）等が報告されており，これらのウイルスは淡水産のサケ・マス類が主な宿主と考えられてきた。しかし，近年 VHSV が海水養殖中のニジマスをはじめ海産魚のシーバス（*Dicentrarchus labrax*）やターボット（*Scophthalmus maximus*）にも病原性を有することが実験的に確かめられ（Castric and De Kinkelin 1980, 1984），サケ科魚類のみならず海産魚に対しても病原性を有していることが明らかとなった。この様にサケ科魚類病原ウイルスとして知られる IHNV や VHSV が幅広い宿主域を持つことが明らかにされつつあり，これらのウイルスに分類学上近縁である HRV がサケ科魚類に対しても病原性を有する可能性が危惧された。

本研究により浸漬感染法による累積死亡率は低かったが，ウィルス検査の結果ではニジマスからウイルスが分離され HRV はニジマスに対して病原性を有している可能性が示唆された。一方，腹腔内接種攻撃法ではニジマスで高い累積死亡率並びに，ウィルス感染価が示され，しかもヒラメの HRV 感染発症魚と同様腹部膨満，筋肉内の出血等の症状が観察され，HRV はニジマスに対して強い病原性が確認された。サクラマスはニジマスにつぐ累積死亡率とウイルス感染価を示し，ニジマスと同様の症状が認められたことからサクラマスに対しても HRV は病原性を有していることが明らかとなった。一方，ギンザケ・サケ・カラフトマスでは感染発症は認められなかったことより，これらの魚主に対しては病原性を示さないものと考えられた。

HRV はヒラメ以外にもサケ科魚類のニジマスやサクラマスに対して病原性を有することが明らかとなり，今後サケ・マス養殖場における HRV の伝播・予防に対して十分留意する必要があることが示唆された。

第 2 節　HRV のニジマスに対する病原性

前章第 1 節で HRV はニジマスに対しても強い病原性を有することが明らかになり，ニジマス養魚場への伝播に対し十分留意する必要のあるウイルスであることが示唆された。一方，同じラブドウイルス群に属する IHNV は我が国やアメリカでニジマス稚魚に死亡率の高い疾病を引き起こし，また VHSV はヨーロッパで稚魚から商品サイズの大きさまでのニジマスに被害を及ぼしている。

HRV が IHNV や VHSV と同様，ニジマスに対して強い病原性を有することが明らかに

なったことからIHNVおよびVHSV同様，ニジマスに対する感染防除策を講ずる必要がある。本節ではHRVのニジマスに対する病原性を供試魚の魚体重と接種ウィルス量の両面から検討するとともに，ニジマスに対するHRVの病原性を現在我国のニジマスに多大な被害を与えているIHNVの病原性と比較検討した。

材料と方法

供試魚

北海道大学水産学部微生物学講座および同学部七飯養魚実習施設内の水槽で孵化後，育成したニジマス稚魚および幼魚を用い，平均魚体重0.2g群（1カ月齢），0.5g群（3カ月齢）を各20尾，3.0g群（6カ月齢）を30尾，6.5g群（9カ月齢）を40尾，14.5g群（12カ月齢）を30尾，さらに18.2g群（15カ月齢）を20尾供試した。6.5g群は20，10，10尾の3群に分けたが，他の各群はすべて10尾ずつとして実験に供試した。3.0g以下の魚体重の供試魚は5 *l* 容の水槽に，それ以上の供試魚は20 *l* 容の水槽に収容し，水温12～14℃の脱塩素水道水で流水飼育した。このうちIHNVとの感受性の比較には3.0gおよび6.5g群のニジマスを供試した。

ウイルス接種法

ウイルスの人工感染試験は全て腹腔内接種法により行い，麻酔およびウイルス接種の手順は前節で述べた方法に従った。

供試魚の魚体重とHRV接種量の感染発症に及ぼす影響を調べるために，Table 8～11に示すとおり，魚体重0.2g群20尾に$10^{3.00}TCID_{50}$/尾（$10^{3.70}TCID_{50}$/g），魚体重0.2g，0.5gおよび3.0g群それぞれ20，10および10尾に$10^{3.75}$～$10^{4.00}TCID_{50}$/尾（各々$10^{4.45}$，$10^{4.30}$，$10^{3.52}TCID_{50}$/g），魚体重3.0g，6.5gおよび14.5g群それぞれ10，20および10尾に$10^{5.30}TCID_{50}$/尾（各々$10^{4.82}$，$10^{4.48}$，$10^{4.12}TCID_{50}$/g），さらに魚体重14.5gおよび18.2g群各10尾に$10^{6.00}$～$10^{6.30}TCID_{50}$/尾（各々$10^{4.82}$，$10^{5.04}TCID_{50}$/g）のHRVを接種した。またIHNVとの感受性の比較には魚体重3.0g群のニジマスに$10^{4.30}$ $TCID_{50}$/尾（$10^{3.82}TCID_{50}$/g），魚体重6.5g群に$10^{5.85}TCID_{50}$/尾（$10^{5.04}TCID_{50}$/g）のIHNVを接種した。供試魚は12～14℃の流水で飼育し，観察期間は0.5gおよび18.2g群で15日間，1.0g群で50日間，他は30日間とした。なお対照群として各魚体重群10尾にウイルス液の代わりにMEM_{10}を接種した群を設けた。

累積死亡率およびウイルス感染価の測定

観察期間中，経日的に死亡尾数を計数し，死亡魚および生残魚を計数して累積死亡率を求め，0.2gおよび0.5gの魚体は1尾ごと，3.0gの魚体は全ての内臓を，6.5g，14.5gおよび18.2g群では腎臓・脾臓混合試料を対象に前章で示した方法と同様にRTG-2細胞を用いたウイルス検査を実施した。

結　果

魚体重とウイルス接種量の感染発症に及ぼす影響

ニジマスにおける魚体重とウイルス接種量の感染発症に及ぼす影響を以下の組合せで検討

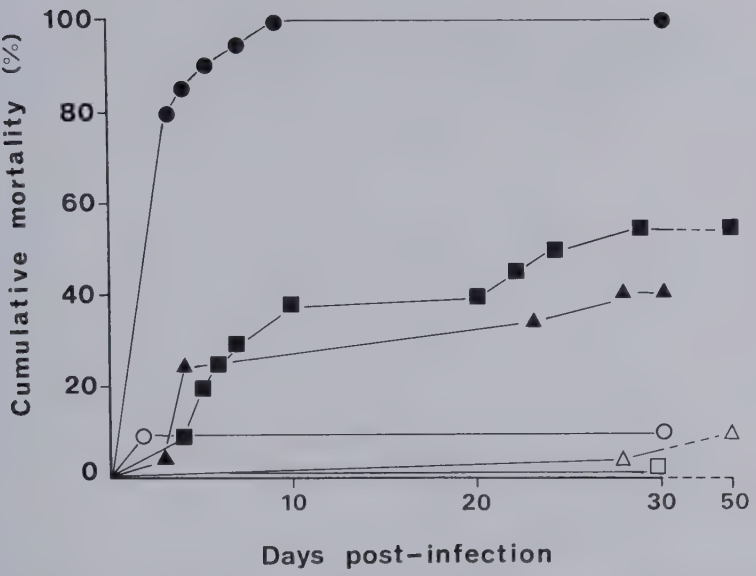


Fig. 3. Comparison of cumulative mortality in different sizes of rainbow trout (0.2-3.0g in body weight) infected with HRV by intraperitoneal injection (dose : $10^{3.75}$-$10^{4.00}$TCID$_{50}$/fish). ○△□ : Control group. ●▲■ : Test group.

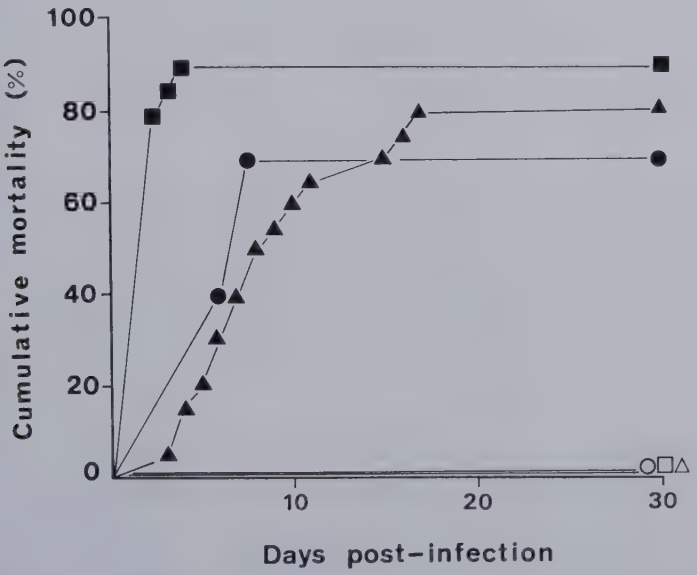


Fig. 4. Comparison of cumulative mortality in different sizes of rainbow trout (3.0-14.5g in body weight) infected with HRV by intraperitoneal injection (dose : $10^{5.30}$ TCID$_{50}$/fish).
○△□ : Control group. ●▲■ : Test group.
□,■ : body weight 3.0g. △,▲ : body weight 6.5g. ○,● : body weight 14.5g.

Table 8. Result of virus isolation from different body sizes (0.2, 0.5, 3.0g in weight) of rainbow trout infected with HRV by intraperitoneal injection.

Body weight (g)	Challenged virus titer (log $TCID_{50}$/fish)	Fish No.	Days p.i.*1	condition	Virus titer (log $TCID_{50}$/g)
0.2	3.00	1	2	D*2	4.05
		2	2	D	3.80
		3	2	D	4.55
		4	4	D	5.80
		5	5	D	3.55
		6	6	D	8.80
		7	10	D	5.30
		8	12	D	5.05
		9	13	D	5.55
		10	13	D	5.55
	3.75	1	2	D	5.55
		2	2	D	4.80
		3	3	D	5.80
		4	3	D	5.05
		5	3	D	4.30
		6	4	D	5.30
		7	5	D	5.55
		8	7	D	5.30
		9	9	D	4.05
0.5	4.00	1	4	D	2.55
		2	5	D	3.30
		3	6	D	5.55
		4	7	D	3.55
		5	11	D	4.30
		6	20	D	2.80
		7	22	D	5.30
		8	24	D	5.55
		9	29	D	4.05
		10		D	4.80
3.0	4.00	1	2	D	6.80
		2	2	D	≦1.80
		3	2	D	3.05
	5.30	1	2	D	5.80
		2	2	D	3.80
		3	2	D	4.05

*1, p.i.: post-infection. *2, D: Died fish.

し，その結果をFig. 3～6に示した。

魚体重0.2g群$10^{4.00}$ $TCID_{50}$/尾（$-10^{3.70}TCID_{50}$/g）のウイルスを接種した場合，3日目より死亡がみられ始め累積死亡率は10日目で35%，14日目で55%，24日目で65%に達した（Fig. 6）。魚体重0.2～3.0gのニジマスに$10^{3.75}$～$10^{4.00}$ $TCID_{50}$/尾のウイルスを接種した場合，魚体重0.2g（$10^{4.45}TCID_{50}$/g）のニジマスでは2日目より死亡が観察され始め5日目に80%，9日目には100%の累積死亡率を示した。0.5g群（$10^{4.30}$ $TCID_{50}$/g）では4日目から死亡が観察され始め観察終了日に55%となった。一方3.0g群（$10^{4.52}TCID_{50}$/g）では3日目に死亡が認められ始め累積

死亡率は30日目で40%となった（Fig. 3）。死亡魚および瀕死魚のウィルス検査の結果では3.0g群の1尾を除き全ての死亡魚からウィルスが分離され，ウイルス感染価は0.2g群で$10^{3.80}$～$10^{5.55}$ $TCID_{50}/g$，0.5g群で$10^{2.55}$～$10^{5.55}$ $TCID_{50}/g$，3.0g群で$10^{3.05}$～$10^{6.80}$ $TCID_{50}/g$であった（Table 8）。各群とも魚体内のウイルス量はほぼ同程度の値を示し魚体重による差は認められなかった。

次に魚体重3.0g～14.5gのニジマスに$10^{5.30}$ $TCID_{50}$/尾のウイルスを接種した場合，3.0g群（$10^{4.82}$ $TCID_{50}/g$）では3日目に80%，5日目に90%の累積死亡率を示した。6.5g（$10^{4.48}$ $TCID_{50}/g$）群では3日目より死亡が見られ始め17日目に累積死亡率が80%に達した。また14.5g（$10^{4.12}$ $TCID_{50}/g$）のニジマスでは接種後6日目に死亡が見られ始め，7日目に70%に達したが以後死亡は認められなかった（Fig. 4）。魚体内のウイルス量は3.0g，6.5gおよび14.5g群の死亡および瀕死個体でそれぞれ$10^{3.80}$～$10^{5.80}$（Table 8），$10^{4.55}$～$10^{7.05}$および$10^{5.80}$～$10^{7.30}$ $TCID_{50}/g$（Table 9）の価を示した。特に14.5g群の死亡魚では供試魚No. 3の$10^{7.30}$ $TCID_{50}/g$の様に極めて高い値を示す個体が見られ，生残魚にも3尾中2尾から$10^{2.80}$および$10^{2.55}$ $TCID_{50}/g$のウィルス感染価が測定された。

さらに魚体重14.5gおよび18.2g群に$10^{6.00}$～$10^{6.30}$ $TCID_{50}$/尾のウイルスを接種した場合，14.5g群（$10^{4.83}$ $TCID_{50}/g$）でウイルス接種後4日目から死亡が見られ始め12日目に累積死亡率は100%に達した。18.2g群（$10^{5.04}$ $TCID_{50}/g$）ではウィルス接種後2日目に発症が見られ始め，3日目に死亡が確認され5日目には累積死亡率が30%，観察期間終了時の15日目には80%に達した（Fig. 5）。死亡魚，瀕死魚の魚体内ウイルス量は14.5g群で$10^{5.05}$～$10^{7.30}$ $TCID_{50}/g$と高い価を示し，供試魚No. 1およびNo. 2のように$10^{7.05}$～$10^{7.30}$ $TCID_{50}/g$と極めて高い値を示す個体も見られた。しかし，18.2g群のウイルス感染価は$10^{4.30}$～$10^{5.80}$ $TCID_{50}/g$であり14.5gに較べ低い価であった（Table 9）。

また，体重が同じでウイルス接種量が異なる場合の累積死亡率を0.2g，3.0g，14.5g群を対象に比較した結果をFig. 6に示した。魚体重0.2gのニジマスに10^{3}および10^{4} $TCID_{50}$/尾，すなわち$10^{3.70}$および$10^{4.45}$ $TCID_{50}/g$，魚体重3.0gのニジマスに10^{4}および10^{5} $TCID_{50}$/尾（$10^{3.52}$および$10^{4.82}$ $TCID_{50}/g$），魚体重14.5gに10^{5}および10^{6} $TCID_{50}$/尾（$10^{4.12}$および$10^{4.82}$ $TCID_{50}/g$）のHRVを接種した場合，累積死亡率は各魚体重共にウイルス接種量が少ない群に較べ，多い群では高い価を示した。

HRVとIHNVの病原性の比較

魚体重3.0gおよび6.5gのニジマスを供試してHRVとIHNVに対する感受性を比較した結果をFig. 7に示した。魚体重3.0gのニジマスにIHNVを$10^{4.30}$ $TCID_{50}$/尾（$10^{3.82}$ $TCID_{50}/g$）接種した群では3日目に45%，4日目に90%，5日目に100%の累積死亡率を示したが，HRVを$10^{4.00}$ $TCID_{50}$/尾（$10^{3.52}$ $TCID_{50}/g$）接種した群では3日目から死亡が見られ始めたものの観察終了時に40%の累積死亡率を示したにすぎなかった（Fig. 7 a）。しかし，HRV接種で死亡した個体では筋肉内の出血，腹水貯留，腎臓・脾臓の出血などが観察されたが（Plate 10, Fig. 51），IHNV接種群には死亡魚に激しい出血などの顕著な症状は認められなかった。

Table 9. Result of virus isolation from different size (body weight 6.5, 14.5, 18.2g) of rainbow trout infected with HRV by intraperitoneal injection.

Body weight	Challenged virus titer (log $TCID_{50}$/g)	Fish No.	Days p.i.*1	condition	Virus titer (log $TCID_{50}$/g)
		1	3	D*2	7.05
6.5	5.30	2	4	D	6.05
		3	4	D	7.05
		4	5	D	7.05
		5	6	M*3	6.55
		6	6	D	5.80
		7	7	M	6.30
		8	7	M	5.30
		9	8	M	6.80
		10	8	D	5.80
		11	9	D	5.80
		12	10	D	5.05
		13	11	M	4.55
		14	15	D	4.80
		15	16	D	5.30
		16	17	D	5.05
		17	30	S*4	≦1.80
		18	30	S	≦1.80
		19	30	S	≦1.80
		20	30	S	≦1.80
		1	6	D	6.55
14.5	5.30	2	6	D	6.80
		3	6	D	7.30
		4	6	M	6.80
		5	7	D	6.30
		6	7	D	6.05
		7	7	M	5.80
		8	30	S	2.80
		9	30	S	≦1.80
		10	30	S	2.55
		1	4	D	4.05
	6.00	2	4	D	7.30
		3	5	D	5.05
		4	5	M	6.05
		5	5	D	6.05
		6	5	D	6.80
		7	9	M	6.55
		8	7	S	6.05
		9	11	S	6.30
		10	12	S	5.05
		1	3	D	4.30
18.2	6.30	2	4	D	5.80
		3	5	D	5.55
		4	6	D	5.05
		5	6	D	5.05
		6	6	D	5.05
		7	8	D	4.30
		8	10	D	4.80

*1, p.i.: post-infection. *2, D: Died fish. *3, M: Moribund fish. *4, S: Survived fish.

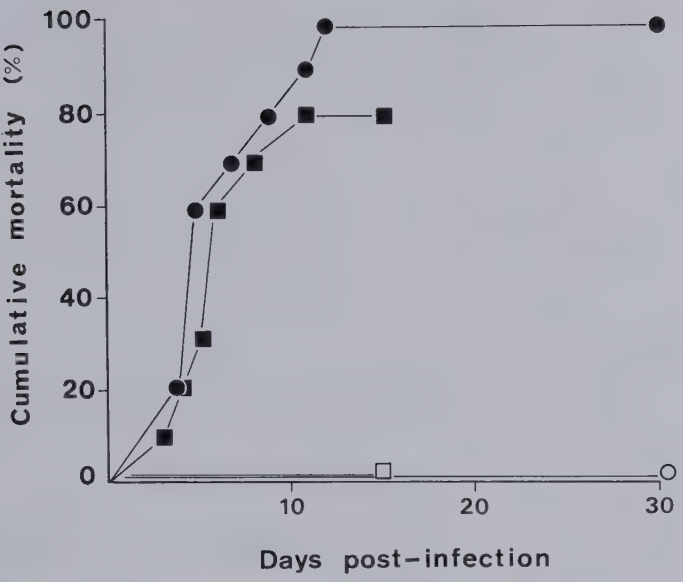


Fig. 5. Comparison of cumulative mortality in different sizes of rainbow trout (14.5g, 18.2g in body weight) infected with HRV by intraperitoneal injection (dose : $10^{6.00}$–$10^{6.30}$TCID$_{50}$/fish). ○△□ : Control group. ●▲■ : Test group. ○,● : body weight 14.5g. □,■ : body weight 18.2g.

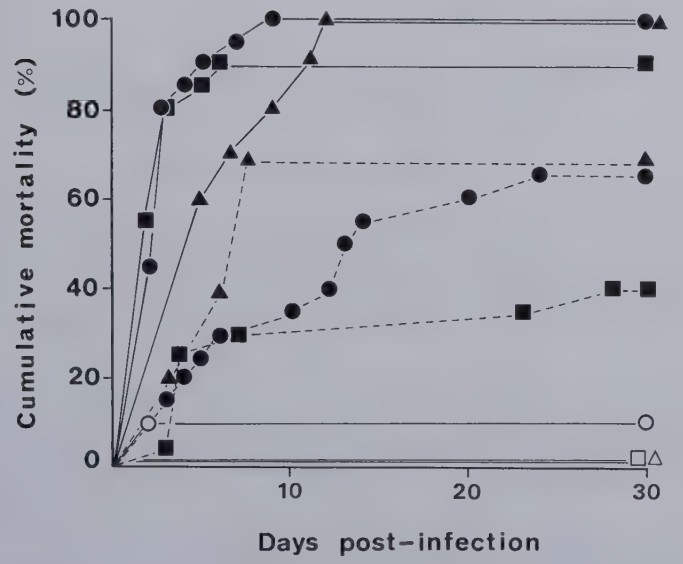


Fig. 6. Comparison of cumulative mortality of rainbow trout infected with different doses of HRV by intraperitoneal injection. ○ : body weight 0.2g. □ : body weight 3.0g. △ : body weight 6.5g. ●—● : dose : $10^{3.00}$TCID$_{50}$/fish. ●—● : dose : $10^{3.75}$TCID$_{50}$/fish. ■—■ : dose : $10^{4.00}$TCID$_{50}$/fish. ■—■ : dose : $10^{5.30}$TCID$_{50}$/fish. ▲—▲ : dose : $10^{5.30}$TCID$_{50}$/fish. ▲—▲ : dose : $10^{6.00}$TCID$_{50}$/fish.

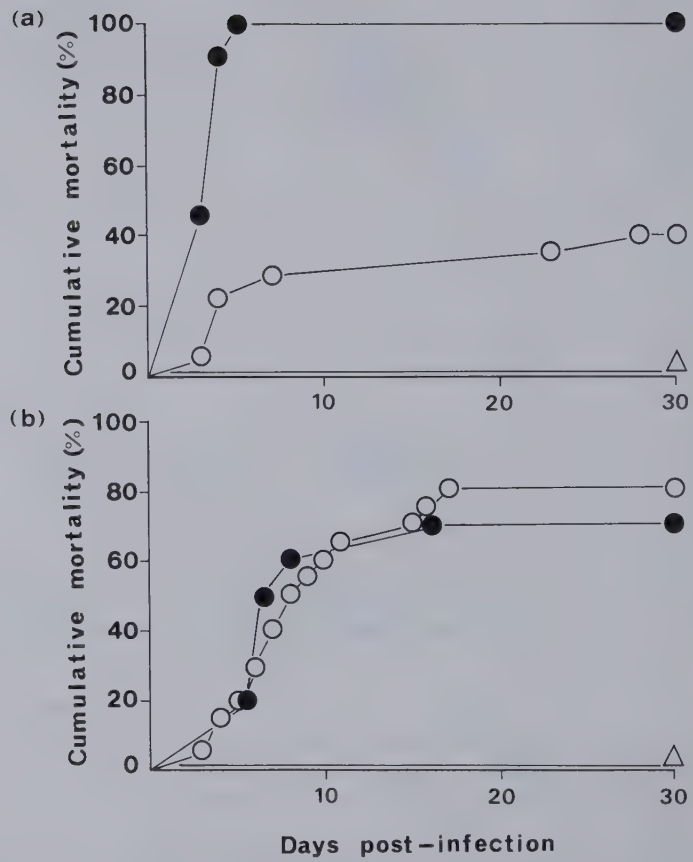


Fig. 7. Comparison of cumulative mortality in rainbow trout infected with HRV or IHNV by intraperitoneal injection. (a): Fish body weight 3.0g (The dose of HRV and IHNV was $10^{4.00}$ and $10^{4.30}$ $TCID_{50}$/fish, respectively). (b): Fish body weight 6.5g (The dose of HRV and IHNV was $10^{5.30}$ and $10^{5.85}TCID_{50}$/fish, respectively).
△ : control group. ○ : test group of HRV. ● : test group of IHNV.

一方，魚体重6.5g群のニジマスに IHNV を$10^{5.85}$ $TCID_{50}$/尾（$10^{5.04}$ $TCID_{50}$/g）接種した群では，5日目より死亡が観察され始め観察終了時には70%の累積死亡率を示した。HRV を$10^{5.30}$ $TCID_{50}$/尾（$10^{4.48}$ $TCID_{50}$/g）接種した群では3日目より死亡が見られ始め17日目に累積死亡率が80%に達した。この場合 IHNV 接種群と HRV 接種群の累積死亡率曲線はほぼ同様のカーブを示した（Fig. 7 b)。魚体内のウィルス量は3.0g群および6.5g群ともに死亡魚，瀕死魚からウィルスが分離され3.0g群の感染価は$10^{3.05}$～$10^{6.80}TCID_{50}$/g，6.5g群でも$10^{4.30}$～$10^{6.30}$ $TCID_{50}$/g（Table 10,11）と高い価を示した。なお魚体重が6.5gの生残魚では HRV，IHNV 接種群ともウィルスは分離されなかった。

Table 10. Result of virus isolation from rainbow trout (body weight 3.0g) infected with HRV or IHNV by intraperitoneal injection.

Virus Species	Challenged virus titer (log $TCID_{50}$/Fish)	Fish No.	Days p.i.*1	condition	Virus titer (log $TCID_{50}$/g)
HRV	4.00	1	2	D*2	6.80
		2	2	D	≦1.80
		3	2	D	3.05
		4	30	S*3	≦1.80
		5	30	S	2.55
		6	30	S	2.30
		7	30	S	3.80
		8	30	S	3.30
IHNV	4.30	1	3	D	6.80
		2	3	D	5.80
		3	3	D	6.30
		4	3	D	6.30
		5	4	D	3.55
		6	4	D	3.30
		7	4	D	3.30
		8	4	D	3.55
		9	4	D	3.80
		10	4	D	5.55
		11	4	D	3.55
		12	4	D	3.05
		13	4	D	3.55
		14	5	D	3.80

*1, p.i.:post-infection. *2, D:Died fish. *3, S:Survived fish.

考　　察

HRV のニジマスに対する病原性を魚体重と接種ウイルス量の両面から検討したが，Table 12にまとめてポした様に供試したニジマスの魚体重範囲内（0.2～18.2g）では１尾当りの接種ウイルス量が一定の場合，魚体重の増加と共にウイルスの病原性が低下する傾向が見られたが，魚体重が18.2gでも接種ウイルス量を多く（約$10^5$$TCID_{50}$/g程度）すると累積死亡率が80%となり，強い病原性を示すことから，接種ウイルス量を供試魚１g当りで換算した場合，魚体重による差はさほど認められなかった。また魚体内のウイルス量は魚体重やウイルス接種量と関係なく，各群ともほぼ同様に高い値を示した。

このように HRV の病原性は魚体重には影響されず主にウイルス接種量により影響されることが明らかになったが，HRV の病原性を同じラブドウイルスに属しニジマスに対して強い病原性を示す IHNV と比較検討したところ，累積死亡率は魚体重3.0gの場合，HRV および IHNV 接種群で，それぞれ40%および100%，魚体重6.5g群では HRV および IHNV 接種群で

Table 11. Result of virus isolation from rainbow trout (body weight 6.5g) infected with HRV or IHNV by intraperitoneal injection.

Virus Species	Challenged virus titer (log $TCID_{50}$/Fish)	Fish No.	Days p.i.*1	condition	Virus titer (log $TCID_{50}$/g)
HRV	5.30	1	3	D*2	7.05
		2	4	D	6.05
		3	4	D	7.05
		4	5	D	7.05
		5	6	M*3	6.55
		6	6	D	5.80
		7	7	M	6.30
		8	7	M	5.30
		9	8	M	6.80
		10	8	D	5.80
		11	9	D	5.80
		12	10	D	5.05
		13	11	M	4.55
		14	15	D	4.80
		15	16	D	5.30
		16	17	D	5.05
		17	30	S*4	≦1.80
		18	30	S	≦1.80
		19	30	S	≦1.80
		20	30	S	≦1.80
IHNV	5.85	1	5	D	5.55
		2	5	D	5.55
		3	6	D	6.30
		4	6	D	5.80
		5	6	M	6.05
		6	8	M	5.55
		7	16	M	4.30
		8	30	S	≦1.80
		9	30	S	≦1.80
		10	30	S	≦1.80

*1, p.i.: post-infection. *2, D: Died fish. *3, M: Moribund fish. *4, S: Survived fish.

それぞれ80%および70%となった。このことからHRVの病原性は魚体重が軽い場合IHNVより低く，魚体重が増すとIHNVとほぼ同程度となり，HRVはIHNVの様に宿主の魚体重による影響を受けにくい傾向のある点で両者は相違した。AMEND *et al*. (1973) や福田ら (1989) は，IHNVは主に稚魚期に感染し，1年魚で発病する場合は死亡率が低く，2年魚では発病しないことを報告している。一方，VHSVは体長6～8cmの稚魚から商品サイズ (250～300g) の成魚にまで被害が報告され，罹病する魚体サイズが広範囲に及ぶことが知られている (BELLET 1965)。したがって，ウイルスの病原性を魚体重の面から考察するとHRVはIHNVよりもむしろVHSVに近いウイルスである可能性が示唆され，今後ニジマスの稚魚のみならず成魚に対してもHRVに対する感染防除策を講じる必要があると考える。

Table 12. Result of infectivity trails in different body weight of rainbow trout infected with HRV or IHNV by intraperitoneal injection.

Virus species	Challenged virus titer (log $TCID_{50}$/fish)	Cumulative mortality					
		Body weight					
		0.2g	0.5g	3.0g	6.5g	14.5g	18.2g
HRV	3.00	65% (3.70)*					
	3.75～4.00	100% (4.45)	55% (4.30)	40% (3.52)			
	5.30			90% (4.82)	80% (4.48)	70% (4.12)	
	6.00～6.30					100% (4.82)	80% (5.04)
IHNV	4.30			100% (3.82)			
	5.85				70% (5.04)		

*Challenged virus titer/body weight, (log$TCID_{50}$/g).

第3節　HRV 人工感染ニジマスの病理組織像

前節までに HRV はニジマスに対してヒラメに対すると同様に強い病原性を有することを明らかにした。そこで HRV 感染症の発生が危惧されるニジマスについて，その予防，診断，防除策等を確立するための基礎的研究として，前節で人工感染試験に供試したニジマスを対象に HRV 感染症の病理組織学的検討を行い，第Ⅰ章におけるヒラメ病魚の病理組織像と比較検討するとともに，IHNV 感染ニジマスの病理組織像とも比較検討した。

材料と方法

供試魚および供試組織

病理組織像の観察には前節で人工感染試験に供試したニジマスのうち 魚体重6.5gおよび14.5g，ウイルス接種量$10^{5.30}$$TCID_{50}$/尾の群ならびに魚体重14.5g，ウイルス接種量$10^{6.00}$ $TCID_{50}$/尾の群およびそれぞれの対照群の魚を供試した。また HRV と IHNV の病理組織像を比較するために IHNV を$10^{5.85}$$TCID_{50}$/尾宛接種した6.5g群のニジマスを供試した。

HRV および IHNV 人工感染供試ニジマスは死亡直後および瀕死魚，生残魚を対象とし，瀕死魚および生残魚では１：5000希釈のMS-222水溶液２lに１～３分間浸漬して麻酔を行ったのち実験に供試した。供試魚は腹部を切開し，腎臓，脾臓，肝臓，筋肉，膵臓，消化管を摘出し光顕用病理組織標本の作成に用いた。

病理組織標本作製法

麻酔した供試魚を水槽より取り上げ，直ちにそれぞれの臓器を摘出し，ブアン氏液で1～2日間固定した。ついで前節で述べた方法に従いパラフィンブロックを作成し，4 μmに薄切した後ヘマトキシレン-エオシン（H-E）染色標本を作成し光学顕微鏡を用いて観察した。

結　　果

腎臓（体腎）：

対照群の腎臓（Plate 11, Figs.52,53）と比較して，魚体重6.5gの瀕死魚の腎臓の造血組織細胞全体に核濃縮，核崩壊等核変性を伴う著しい壊死巣が観察され，造血組織中の毛細血管にも激しい出血が見られた（Plate 11, Fig.54）。この様な壊死巣では，塩基性色素による染色性の低下や細胞の融解壊死とその周囲に繊維素の沈着も観察された。しかし，腎臓の大部分占める尿細管上皮には顕著な変性は認められなかった。また魚体重14.5gの群ではウィルス接種量の異なる2群共に病魚の腎臓造血組織に上記と同様の病理組織像が認められた（Plate 11, Fig.55）。

IHNV感染ニジマス病魚の腎臓では，HRV感染病魚同様，造血組織細胞全体に核の膨化，濃縮，崩壊等の退行変性を伴う著しい壊死が観察された。さらに造血組織の壊死域中の尿細管上皮には核濃縮，核消失を伴う壊死変性が認められた（Plate 11, Figs.56,57）。

頭腎：

腎臓同様，供試した3群全てのニジマス瀕死魚の頭腎には組織内全体に及ぶ著しい核退行を伴う壊死変性と激しい出血像が観察された（Plate 12, Fig.60）。壊死した組織は消失し，消失部分に置き代わり血球が浸潤して血海状を呈していた。また出血部には繊維素の沈着も観察された（Plate 12, Fig.61）。

IHNV感染病魚の頭腎でも組織内全体におよぶ壊死および出血による血海像が認められ，HRV接種群とほぼ同様な組織像が観察された（Plate 12, Figs.62,63）。

脾臓：

HRV感染群のニジマス病魚の脾臓ではウィルス接種後5日以内の比較的早期に死亡した個体に，中心動脈や莢動脈およびその周囲の莢組織に核消失を伴う融解壊死が観察され，脾髄組織中で小塊として分画されていた（Plate 13, Figs.66,67）。また，組織全体に広範囲に及ぶ核濃縮，核消失を伴う細胞の壊死像が観察されたが，瀰慢的であり顕著な巣状壊死は認められなかった。しかし，死亡に至る経過日数が増すに従い出血や壊死症状は著しくなり，比較的後期（魚体重6.5gおよび14.5g，接種量$10^{5\cdot30}$ $TCID_{50}$/尾の群でそれぞれ7日目および9日目以降）に死亡した個体の脾臓では組織内全体の壊死変性に加えて出血が著しく頭腎同様の血海状を呈し，繊維素の沈着も観察された（Plate 13, Figs.68,69）。魚体重14.5g，接種量$10^{6\cdot00}$ $TCID_{50}$/尾の群でも比較的後期に顕著な出血や壊死は認められたが，血海状の変化は観察されなかった。

一方，IHNV感染病魚の脾臓では発病経過に関係なく全ての発症魚において脾臓組織内全体に及ぶ瀰慢的な核の濃縮，消失を伴う壊死および脾髄部の中心動脈や莢動脈，莢組織の細胞融解壊死変性が観察されたが，HRV感染病魚の組織内に見られた様な血海状を呈するほどの激

しい出血は認められなかった（Plate 13, Figs.70,71）。

肝臓：

HRV 接種群のニジマス病魚の肝臓は死亡に至る経過日数の違いにより病理組織像が異なっていた。魚体重やウイルス接種量に関係なく，ウィルス接種後比較的早期に死亡した個体には顕著な病変は認められなかった（Plate 14, Figs.74,75）。しかし，魚体重6.5gおよび14.5g（接種量$10^{5.30}$ $TCID_{50}$/尾）の2群ではそれぞれ6日目および9日目に死亡した個体の肝組織中に部分的な出血と肝門脈や肝動脈の一部に充血が認められた。以後死亡に至る経過日数が増えるにつれて出血の度合が著しくなり，比較的後期（魚体重6.5gおよび14.5g，接種量$10^{5.30}$$TCID_{50}$/尾の群でそれぞれ11日目および12日目以降）に死亡した個体では組織中の各所に著しい出血が観察され，組織内全体に及ぶ広範囲な核濃縮を伴う細胞の壊死像が認められた。特に出血部位周囲の肝細胞では色素による染色性が低下し，水腫様の顕著な核融解を伴う細胞の融解壊死病巣が観察された。壊死巣周囲には間質の繊維組織と考えられる結合組織の増殖が若干観察された（Plate 14, Figs.76,77）。一方，魚体重14.5g（接種量$10^{6.00}$$TCID_{50}$/尾）の群では死亡時期に関係なく顕著な変性は認められなかった。

IHNV 接種群のニジマス病魚では，死亡時期に関係なく組織内の各所に激しい出血が見られ，水腫様の核変性を伴う細胞の融解壊死が顕著に認められた（Plate 14, Figs.78,79）。この IHNV 感染魚の病理組織像は比較的後期に死亡した HRV 感染病魚の組織像とほぼ同じであった。

体側筋：

HRV 感染魚では全ての病魚に外見的には線条，斑状に見られる体側筋内の毛細血管の充血および出血が観察された。組織像でも毛細血管中に多くの血球が密に詰まり血管が充血，怒張していた。また一部血管壁が破損し筋組織中に血球の浸潤像が観察された。特に全ての病魚で頭腎背側部の筋肉中の頭腎周囲および背側の真皮下部の出血が顕著であった（Plate 15, Figs.82,83）。

IHNV 感染病魚では筋肉中に点状の出血が観察されたが，HRV 感染病魚と比較した場合，出血が少ないかまたは全く認められない場合もあった（Plate 15, Figs.84,85）。

膵臓：

膵臓では全ての群で部分的に外分泌部腺房の毛細血管周囲や外縁の細胞に核濃縮をともなう壊死が認められたが，腺細胞内の好酸性物質を含め外分泌部腺房全体に及ぶ顕著な壊死変性は観察されなかった（Plate 16, Figs.88,89）。

また，IHNV 感染病魚の膵臓でも HRV 感染病魚と同様に一部の外分泌部腺細胞に核濃縮を伴う壊死が観察された。しかし，組織全体には顕著な変化は認められなかった（Plate 16, Figs.90,91）。

腸管：

HRV 感染病魚では魚体重やウィルス接種量に関係なく観察した全個体の腸管の粘膜層固有層，粘膜下組織，筋層ともに顕著な変性は認められなかった（Plate 17, Figs.94,95）。

一方，IHNV 感染病魚の腸管には粘膜下組織や緻密層中のエオシン好性顆粒細胞に核濃縮，核崩壊を伴う細胞壊死が観察された（Plate 17, Figs.96,97）。粘膜上皮では一部の細胞で核濃縮をともなう壊死が見られたが，筋層，膜では顕著な変性は認められなかった。また粘膜層，筋層中の毛細血管に充血・出血は観察されなかった。

考　　察

前節で HRV の人工感染試験に供試したニジマスを対象に，まずその病理組織像をヒラメの組織像と比較検討すると共に，魚体重およびウイルス接種量が異なった場合に病理組織像上に現われる変化を観察した。

ニジマスでは多くの組織で魚体重およびウイルス接種量に関係なく同一の病理組織像を示した。すなわち，腎臓の造血組織では核濃縮，核崩壊等核変性を伴う著しい壊死と毛細血管の激しい出血が，脾臓の脾髄では中心動脈，英動脈，英組織に核変性を伴う顕著な融解壊死が，さらに体側筋，特に頭腎背側部では毛細血管の著しい充出血が観察された。なお，脾臓と肝臓では比較的後期に死亡した個体で接種ウイルス量の異なる 2 群で違いが認められた。接種量の少ない群では脾臓に組織内全体に及ぶ壊死と著しい出血が観察され，肝臓では組織中に著しい出血と核濃縮を伴う細胞壊死が認められた。これに対して，接種量の多い群では比較的後期に死亡した個体においても早期の死亡魚同様に脾臓の顕著な出血は見られず，肝臓の病変も認められなかった。このことは接種量が少ない場合，ニジマスでは出血性の貧血により死に至る期間が長くなり，脾臓の血管壁や肝臓組織内の変性が徐々に進行し，最終的に顕著な病変となって現われたものと推察される。

この HRV 感染ニジマスの病理組織学的所見を前章の HRV 感染ヒラメの病理組織像と比較した場合，両魚種ともに腎臓の造血組織に核濃縮，核消失，核膨化といった核の退行を伴う壊死像や著しい出血および脾髄組織に著しい核変性を伴う壊死が観察され，腎臓・脾臓が HRV の主な標的臓器である可能性が示唆された。また体側筋繊維間に血管の充血による怒張や毛細血管の出血が観察され，これらの腎臓，脾臓および筋肉の病理組織像が HRV 感染症の主な特徴であると考えられる。しかし，肝臓ではヒラメには病変が認められずニジマスでは顕著な出血および壊死がみられる個体と病変の見られない個体が存在し，腸管ではヒラメで観察された出

Table 13. Summary of comparative histopathology of HRV and IHNV infected rainbow trout.

Virus	Organ						
	Ant. Kidney	Kidney	Spleen	Liver	Muscle	Pancreas	Intestine
HRV	Necrosis Hemorrhage	Necrosis Hemorrhage	Necrosis Hemorrhage	Normal Necrosis Hemorrhage	Hemorrhage	(Necrosis)	Normal
IHNV	Necrosis Hemorrhage	Necrosis	Necrosis	Necrosis Hemorrhage	(Hemorrhage)	(Necrosis)	Necrosis

( ): Not remarkable.

血がニジマスでは認められなかった点が両者で相違していた。

次に人工感染による HRV 感染ニジマスの病理組織像を IHNV 感染ニジマスの組織像と比較した（Table 13）。両ウイルス接種群の累積死亡率はそれぞれ80％と70％とほぼ等しく，累積死亡率曲線も同様のカーブを示した（Fig. 7）。IHNV 感染ニジマスの病理組織は腎臓では HRV 感染魚同様，造血組織の顕著な壊死と出血，尿細管上皮の細胞変性および壊死が認められ，脾臓では組織内全体に及ぶ瀰慢的壊死および脾髄部，中心動脈や莢動脈，莢組織の壊死変性が顕著であった。これら IHNV 感染魚の病理組織像は HRV 感染魚と類似していたが，IHNV 感染魚では腎臓・脾臓の出血，筋肉の点状出血が顕著ではなく，肝臓では早期に死亡した個体を含め全個体に実質細胞の核変性を伴う壊死や出血が観察された。さらに腸管では粘膜下結合組織や緻密層中のエオシン好性顆粒細胞に核濃縮，核崩壊を伴う細胞壊死が認められた点 HRV 感染症の組織像と異なっていた。すなわち，HRV と IHNV 感染症を病理組織像の面から比較すると多くの点で類似しているものの，特に YASUTAKE（1970）により IHNV 感染魚に特有であると報告された粘液便垂下の原因と考えられる緻密層の好酸性顆粒細胞の壊死変性が HRV 感染魚では観察されず，HRV と IHNV 感染ニジマスは病理組織像の面からも明瞭に区別することができた（OSEKO *et al*.1990）。IHNV および VHSV 感染症の死亡要因として腎臓組織の糸球体中の毛細血管の変性による腎炎が考えられ，ELGER and HENTSCHELL（1983）は VHSV に感染したニジマスの腎臓の糸球体を電顕により観察し，糸球体中の毛細血管壁に非水溶性で高分子の免疫複合体（GN）の沈着を認め，これがニジマスの浸透圧調節を狂わせ，結果的に死亡に至らせると仮定している。さらに ELGER *et al*.（1986）はその根拠に腹水貯留や脳室内の水分貯留による眼球突出といった水腫を挙げ，また尿液中の電解質の変動も観察し，この仮説を支持する結果を報告している。しかしながら，HRV 感染ニジマスでは，尿細管には変性が認められず，腎小体の発達していない海産魚のヒラメ病魚にもニジマスと同様な腹水貯留等の水腫を引き起こすことから，HRV 感染魚の死亡要因としては糸球体の変性による浸透圧調節の機能障害よりも，ウイルスの主要な増殖場所と考えられる腎臓の造血組織の病理変性，末端の毛細血管の破損による血液循環障害が主であると考える。

第Ⅲ章　In vitro および in vivo における HRV の感染細胞中での増殖像

前章までに HRV 感染魚の病理組織像は IHNV および VHSV と類似した特徴を示すことを明らかにした。そこで HRV の培養細胞中における増殖像及び生成物について他のラブドウイルスとの異同を明らかにするため電子顕微鏡観察を行い，併せて生体内における HRV の増殖像について検討を行った。

本章ではまず第1節において培養細胞を用い in vitro で HRV 感染細胞を観察し，HRV の増殖過程と細胞に見られる HRV の構築物について観察して，IHNV，PFRV，EVA，EVEX

の4種のウィルスの増殖過程と比較検討した。次いで第2節では in vitro での知見に基ずき，徳島県下で自然発症したヒラメ病魚および前章第1節で人工感染試験に供試したニジマスを対象に HRV の標的臓器である腎臓での増殖過程および増殖の場を in vivo で観察した。

第1節　In vitro における HRV の増殖像

前章までの病理組織学的検討結果から HRV 感染症は腎臓の造血組織，脾臓の脾髄に核変性を伴う顕著な壊死を引き起こすことが明らかとなった。HRV の感染魚体内での増殖部位および増殖過程を観察するに先立ち，まず HRV をはじめ魚類病原ラブドウイルスに幅広い感受性を有する RTG-2 細胞を供試し，in vitro における HRV の増殖過程および HRV 感染細胞の構造変化を既知の魚類病原ラブドウイルスIHNV、PFRV、EVA、EVEX の増殖像と比較検討した。

材料と方法

供試細胞

供試細胞として，ニジマスの生殖線由来の RTG-2 細胞を用いた。細胞は直径2.5cmの組織培養用プラスチックプレート（テルモ）でMEM_{10} Tris培地を用い，15℃24時間培養後感染試験に供試した。

供試ウィルス

HRV は1984年に兵庫県下の養殖ヒラメから分離した8401-H株を，また対照の魚類病原ラブドウイルスとしては英国国立魚病研究所のB. J. Hill博士より分与を受けた IHNV H 株および EVA，東京水産大学の佐野徳夫博士より分与を受けた EVEX，さらに仏国国立水産研究所の P. De Kinkelin博士より分与を受けた PFRV 株の4株を供試した。これらの供試ウイルスは，使用するまで−80℃に保存した。

細胞培養液中のウイルス量の測定

RTG-2 細胞にm.o.i.が2となるように各ウイルスを接種し，1時間の吸着を行った後 Hanks 液で洗浄し，新たに培地を加えて培養し，2時間おきに培養液の産生ウイルス量を測定した。なおウィルスの感染価は RTG-2 細胞を用いた常法のマイクロタイタープレート法により測定し$TCID_{50}$/ml として示した。

電顕試料作成

培養液のウイルス量を測定した細胞はパラフォルム・グルタールアルデヒド混合液で4℃12時間の前固定を行った。これらの細胞はシリコンポリスマンで剝して3000r.p.m.で10分間遠心した後，上清液を捨て，カコジレート緩衝液で2回遠心洗浄を行い0.4%オスミック酸で4℃2時間後固定した。後固定終了後カコジレート緩衝液で3回遠心洗浄を行い，以後前章で述べた方法にしたがって脱水し，エポン樹脂包埋を行い，超薄切片を作成した。作成した切片は酢酸ウラニール，酢酸鉛で2重染色を施し電子顕微鏡，日立H 7000を用い75kvで観察した。

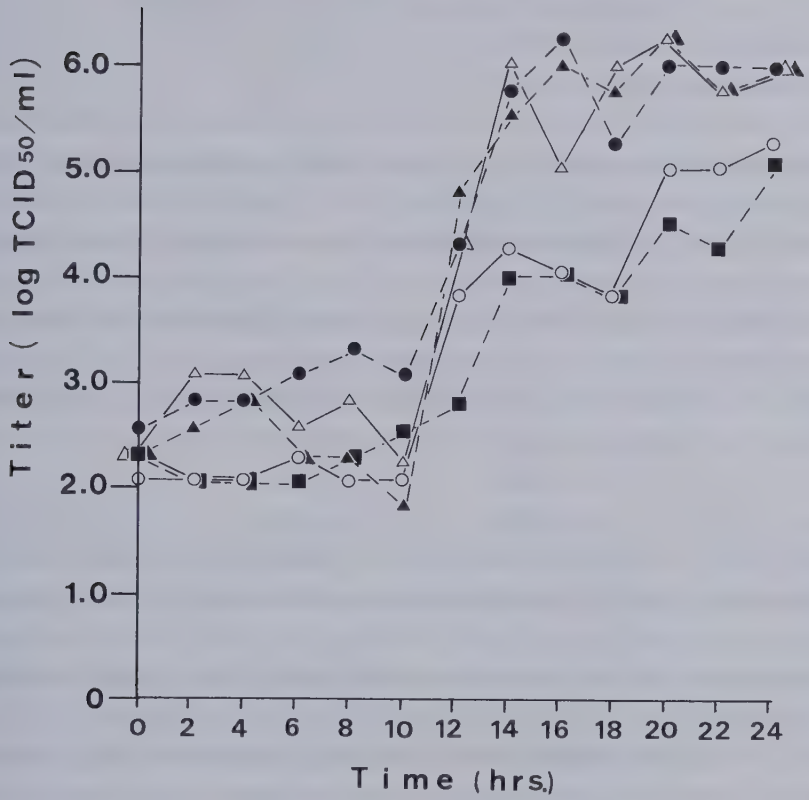


Fig. 8. Hourly trend of virus titers in cultured fluid on the RTG-2 cells infected with HRV, IHNV, PFRV, EVA and EVEX, respectively.
●——●：HRV. ○——○：IHNV. ■——■：PFRV,
▲ --▲：EVA. △——△：EVEX.

光顕試料作成

電顕試料作成に用いた各ウィルス感染細胞のエポン樹脂包埋ブロックを1 μmに薄切し，スライドグラスに載せ，1％トルイジンブルー，1％ホウ酸ナトリウム水溶液で60℃に加温しながら5分間染色した。染色後水洗し，充分乾燥した後，封入し光顕観察を行った。

結　　果

細胞培養液中のウィルス量の経時変化

ウイルスを接種した細胞の培養液中のウィルス感染価の経時変化をFig. 8に示した。ウイルス接種後10時間目までは HRV, IHNV, PFRV, EVA, EVEX ともにウィルス感染価はほぼ 10^2～10^3TCID$_{50}$/mlと低い価を示したが，ウイルス接種後12～14時間目にかけて各ウイルスとも急激な感染価の増加が観察された。12時間目以降24時間目まで HRV では $10^{5.40}$～$10^{6.30}$

$TCID_{50}/ml$, EVA では$10^{5.05}$～$10^{6.30}$ $TCID_{50}/ml$, EVEX では$10^{5.55}$～$10^{6.55}$ $TCID_{50}/ml$を示した。IHNV と PFRV では14時間目以降でも漸次増加してゆき，24時間目に感染価は IHNV および PFRV でそれぞれ$10^{5.30}$および$10^{5.05}$ $TCID_{50}/ml$に達した。

ウイルス感染細胞の光顕観察

供試した各ウイルスによる細胞の CPE をPlate 18, Figs.98～103に示した。RTG-2 細胞は繊維芽性細胞で通常偏平で紡錘形を示す（Plate 18, Fig.98）が，HRV 感染後22時間目，IHNV では20時間目に一部の細胞において核が膨潤して肥大化し，細胞の形態が緩やかな球形を示し，トルイジンブルーによる細胞質の染色性が低下した（Plate 18, Figs.99, 100）。PFRV では20時間目に核および細胞の肥大化が観察された。しかし，細胞質の染色性には変化が見られなかった（Plate 18, Fig.101）。EVEA, EVEX では16時間目に細胞が顕著な球形化を示した。この球状細胞は核が消失し，多くの空胞や顆粒状物質で満たされていた（Plate 18, Figs.102,103）。いずれのウイルスでも形態変化を示す細胞は時間の経過に従って増加し，24時間目ではほとんどの細胞が変性を示した。

RTG-2 細胞におけるウイルスの増殖像

HRV：

HRV を接種した RTG-2 細胞の電顕像にはウイルス接種後 6 時間目までは対照の細胞と比べて変化は認められなかった。8 時間目に細胞質全体の電子密度が低くなったが，所々に電子密度の高い大きさ0.3～0.4μmのミトコンドリアと考えられる円形または楕円形の構造物が観察された（Plate 19, Fig.104）。また，細胞膜の表面の一部に電子密度の比較的高い突起状構造物の出現が観察され始めた。ウイルス接種後10時間目も 8 時間目とほぼ同様であったが，12時間目になると一部の細胞の細胞膜上に初めてウイルス粒子の出芽像が認められた。12時間目以降になるとこの様なウイルスの出芽像が大部分の細胞の細胞膜表面に見られ，細胞間にもラブドウィルス群の特徴である砲弾型をした大きさ約80×180nmのウィルス粒子が観察された（Plate 19, Fig.105）。ウィルス接種後，時間が経つにつれ著しいウィルスの出芽像が観察され，細胞周囲に貯留しているウィルス量が増加した。またウィルス接種後12時間目から突起物の表面からも，ウィルスの出芽が認められた。この突起状構造物は12時間～24時間目の細胞膜表面上に頻繁に出現し（Plate 19,Figs.106,107），突起物は電子密度が比較的高く内部には微小繊維状の構造を持っていた。その形や大きさは切断面の太さが 1 μmで長さ1.8μmと非常に大きな棍棒状をはじめ直径約0.6μmの球形（Plate 20, Fig.108），幅約0.4μmで長さ約 1 μmの棒状のもの（Plate 20, Fig.109），幅約80nmで長さ約0.8μmの紐状のもの，幅が狭い紐状で長さが 3 μmと非常に長いもの（Plate 20, Fig.110）等様々であった。ほとんどの突起物の表面には多くのウィルス粒子の出芽が認められた。形態を保持している細胞ではウィルス粒子の出芽像は細胞膜上に散在して見られるか，または細胞膜に出現した突起の表面上に集中して見られ，細胞質中には認められなかった。22～24時間後の RTG-2 細胞では核が肥大し，細胞膜が破損して細胞内容物が流出していたり，細胞が収縮し細胞質の電子密度が高くなり細胞膜が複雑に湾曲するような著しい変性が見られ，崩れかけている細胞の表面や変性した細胞の間，さらに

細胞内の空胞にも多くのウィルス粒子が観察された（Plate 20, Fig.111)。

IHNV：

IHNV感染RTG-2細胞ではHRV感染細胞と同様，8時間目までは対照の細胞と比較して変化は認められなかった。10時間目になると細胞質の電子密度が著しく低下し，逆に細胞質膜は電子染色で濃く染まり，細胞内に電子密度の比較的高いミトコンドリアと考えられる構造物が観察された。IHNV感染細胞はHRV感染細胞と比較してさらに細胞質の電子密度が低下し，細胞質自体の構成成分が希薄になった（Plate 21, Fig.112)。IHNV粒子も12時間目より出芽像が観察され始め，大多数のウィルス粒子の出芽は細胞膜上で明瞭に観察され，大きさは約80×160～180nmであった（Plate 21, Figs. 113,114)。また，12時間目以降にHRV感染細胞と比較して極めて希ではあったがHRVで観察された突起物と類似した棒状の突起状構造物が観察され，その表面にはウィルス粒子の出芽が観察された（Plate 21, Fig.115)。しかし，紐状の突起物は認められなかった。20時間目になるとHRVと同様に細胞質の電子密度の高い細胞質中に多くの空胞を持つ球形化した細胞が観察された。

PFRV：

PFRV感染細胞もウィルス接種後10時間目までは感染細胞になんらの変化も認められなかったが，12時間目になると細胞質膜にウィルスの出芽像が観察され始めた。ウイルス粒子の大きさは約60～80×130～150nmであった（Plate 22, Figs.116,117)。観察されたウィルス粒子のほとんどは形態の保持が悪く，ウィルスの外部形態および内部形態を明瞭に観察することは困難であった。細胞質はHRVやIHNVで観察された様な細胞質の電子密度の低下や変性したミトコンドリア様の構造は認められなかった。また，12時間目の感染細胞では細胞膜表面に特有の竿状や袋状構造物が観察された。竿状の構造物は横断面が直径40～50nmの円形で，最大長が約1 μm非常に長く，中空で電子密度の高い縁を持っていた（Plate 22, Fig.118)。袋状構造物は最大のもので幅267nm, 長さ600nmの大きさを示し，竿状構造物と同様に中空で電子密度の高い縁を持っていた（Plate 22, Fig.119)。また，感染細胞の細胞膜は一部に崩壊が見られ波状を示していた。20時間目にはHRV感染細胞で見られた球形化した細胞と同様な細胞が観察された。

EVA：

EVA感染細胞ではウイルス接種後10時間目までは変化が認められず，ウィルス粒子の出芽像が観察された時間は他のウイルスと同様にウィルス接種後12時間目であった（Plate 23, Figs.120,121)。この時の細胞質の染色性やミトコンドリアには，PFRV感染細胞と同様に変化は見られなかった。ウィルスの出芽は細胞膜のみで観察され，HRVで見られた突起物やPFRVで観察された竿状，袋状構造物は認められなかった。なお，ウイルス粒子の大きさは約55×160～180nmであった。

EVEX：

EVEX感染細胞でも他のウィルスと同様10時間目まで変化は認められず，12時間目に初めて大きさ約60×160～180nmのウィルス粒子の出芽が観察された（Plate 24, Fig.122)。細胞質の

染色性にはPFRV, EVA感染細胞と同じく変化は認められなかった。また12時間目に細胞膜表面にPFRVで観察されたものと同様な幅65～80nm，長さ1.5μmほどの大きさの竿状または袋状構造物が観察された（Plate 24, Fig.123）。しかし，HRV感染細胞で観察されたような突起状構造物は認められなかった。ウイルス接種後16時間目から球形化した感染細胞が認められ始めた。この球形化した細胞は細胞質の電子密度が高く，特にミトコンドリアが著しく濃染して，内部には多くの空胞が観察された（Plate 24, Fig.124）。24時間を経過すると球形化し崩壊した細胞が多く観察され，細胞内の空胞中や湾曲した細胞膜上およびその周辺に多くのウィルス粒子が観察された（Plate 24, Fig.125）。

考　　察

今回供試したHRV, IHNV, PFRV, EVAおよびEVEXはいずれも細胞の球形化を特徴とするCPEを発現したが各ウイルス感染細胞の切片を光顕観察したところ，HRV, IHNV, PFRVでは20～22時間目，EVA, EVEXでは16時間目から細胞の球形化が観察された。またHRV, IHNV, PFRVでは核の肥大化と染色性の低下，EVA, EVEXでは核の消失と空胞・顆粒状物質の充満が観察される等の相違も明らかにされた。一方，電顕観察の結果はTable 14にまとめた。BARONIET *et al*.（1982）はVHSVを感染させたRTG-2細胞で同様の観察を行い，ウイルス接種後8時間目に細胞質中に顆粒状繊維構造の束やゴルジ体様の空胞，12時間目に顆粒状繊維構造周辺で電子密度の高いリング状構造物および細胞膜表面に中空なウイルス粒

Table 14. Comparative electron microscopical characteristics of morphological changes on RTG-2 cells infected with different fish rhabdovirus, HRV, IHNV, PFR, EVA and EVEX.

Virus	Character		
	8－10 hr. P.I.*	12 hr. P.I.	12－24 hr. P.I.
HRV	Lower electron-dense of cytoplasm Degeneration of mitochondria	Budding of viral particles (80×180nm)	Club-like, cord-like protuberance
IHNV	Lower electron-dense of cytoplasm Degeneration of mitochondria	Budding of viral particles (80×160～180nm)	Club-like protuberance
PFRV	－	Budding of viral particles (60～80×130～150nm)	Rod-like, bubble-like structure
EVA	－	Budding of viral particles (55×160～180nm)	－
EVEX	－	Budding of viral particles (60×160～180nm)	Rod-like, bubble-like structure

*: post infection.

子のエンベロープ様構造（empty virus envelopes）を観察している。またウイルス粒子の出芽は24時間目からで，平均粒子サイズは57×165nmであったと述べている。

本節で観察した結果およびVHSVに関する報告（Baroni *et al*.1982）に基ずき各ウイルスを比較すると，まずウイルスの出現時期は各ウイルスともに12時間目前後であった。VHSVではBaroni *et al*.（1982）が24時間目としているが，De Kinkelin and Scherrer（1970）は11時間目に出芽を観察している。m.o.i.を1～2とした場合，魚類ラブドウイルスは12時間目前後が出芽時期と考えられる。光顕観察で感染細胞の球形化および核の変性が観察された時期は最も早いEVA, EVEXでも16時間目以降であり，ウイルスの増殖は細胞の形態変化より前に既に始まることが明らかとなった。なお観察されたウイルス粒子はPFRVを除き，各ウイルスとも約60～80×160～180nm（PFRVは長さ130～150nm）程度の大きさで，ネガティブ染色の結果（Zwillenberg *et al*. 1965, Darlington *et al*. 1972, Fijan 1972, De Kinkelin *et al*. 1973, Cohen and Lenoir 1974, Olberding and Frost 1975, Sano 1976, Sano *et al*. 1977）と一致した。

つぎにウイルス粒子が出芽する迄の細胞内の変化はHRV，IHNVで8～10時間目に細胞質の電子密度が低下しミトコンドリアに変性が観察されたがPFR, EVA, EVEXでは変性は認められず，*Lyssavirus*属に特有な変化と考えられた。一方，Baroni *et al*.（1982），Zwillenberg *et al*.（1965），De Kinkelin and Scherrer（1970）らはVHSVで顆粒状繊維およびリング状構造物を報告し，これらがウイルス形成に関与することを指摘している。しかし，本節で観察したウイルス感染細胞にはこれらの構造物は観察されなかった。

ウイルスの出芽時期にはPFRVおよびEVEXで電子密度の高い縁で囲まれた中空の竿状および袋状構造物が観察された。類似した構造物はVHSVでBaroni *et al*.（1982）により観察され，エンベロープのみの空のウイルス粒子とされている。したがって，PFRVおよびEVEXで見られたこれらの構造物も空のウイルスであると考えられるが，今後さらに検討する必要があるものと思われる。一方，HRVおよびIHNV感染細胞に比較的電子密度が高く内部に微小繊維構造を持つ突起状の構造物が細胞膜表面上に観察されその表面に多くのウイルス粒子の出芽像が観察された。特にHRV感染細胞で頻繁に見られたこの突起状構造物はIHNVでは極く希であり，他のウイルスでは見られずVHSVにも報告例がないことからHRVに特徴的なものと考えられる。HRVと同じ*Rhabdovirus*科*Lyssavirus*属の狂犬病ウイルス（rabies virus）は細胞質内にネグリ小体やリッサ小体等の特有な封入体を形成する（Matumoto 1962, Matumoto *et al*.1974）ことが知られ，HRV感染細胞で観察された突起状構造物は細胞表面上に形成されたがこの突起物表面に多くのウイルス粒子の形成が見られることから，ネグリ小体の一種である可能性が示唆された。また現在狂犬病ウイルスの診断に蛍光抗体法や酵素抗体法によるネグリ小体の検出が行なわれている（Coons and Kaplan 1950）ことから，この構造物がHRVの迅速診断に応用できる可能性が示唆されたが，この点に関しては今後の検討課題である。

第2節　In vivo における HRV の増殖像

本節では HRV の標的組織での増殖部位および増殖過程を検討すると共に，特徴的な構築物の有無を観察することを目的として徳島県下で自然発症したヒラメおよび人工的に HRV に感染させたニジマスの腎臓の電顕観察を行なった。

材料と方法

供試魚および供試組織

1988年3月に徳島県水産試験場内で飼育中に自然発症したヒラメ病魚3尾および前章で人工感染試験に供試した魚体重18.2gのニジマス18尾を供試した。

供試ヒラメ病魚は，発症が観察された後，直ちに開腹して腎臓を摘出した。またニジマスは前章第3節と同一の条件で飼育後同一条件でウイルス接種を行い，接種直後より毎日1回5日間（発症の観察され始めた2日目のみ1日2回），3尾ずつを取り上げMS-222で麻酔後腎臓を摘出し，両魚種共に電顕用試料の作成に供試した。なお，人工感染したニジマスついては前章と同様の方法でウイルス感染価の測定を行なった。

電顕標本の作成

摘出した腎臓は細切し，パラフォルム・グルタールアルデヒド混合液で4℃8時間前固定を行い，0.1Mカコジレート緩衝液で2回洗浄し，次いで1％オスミック酸で4℃2時間後固定した。固定後同緩衝液で三回洗浄し，50，70，80，90，95％のエタノールで0℃15分間ずつ順次脱水し，さらに100％エタノールで15分間ずつ3回脱水した。ついで置換剤QY-1（応研社）で30分，エポン樹脂（Epok812，応研社）とQY-1の混合液（エポン樹脂：QY-1＝1：3，1：1，3：1）で順次2時間ずつ樹脂を浸透，置換させエポン樹脂に包埋した。エポン樹脂は60℃で12時間硬化させてブロックとし，ウルトラミクロトームで薄切した後，酢酸ウラニル，クエン酸鉛で二重染色を行い日立製電子顕微鏡H-7000を用い75kvで観察した。

結　　果

自然発症ヒラメの電顕像

作成標本中のウイルス粒子を見い出すことは非常に困難であったが，供試した3個体中2個体の腎臓組織内に造血組織の細網細胞の細胞膜表面や崩壊している細胞中に大きさ約80×180 nmの砲弾型のウイルス粒子が観察された（Plate 25，Figs.126～129）。しかしながら，観察されたウイルス粒子の大部分は形態保持がよくなく，また HRV 感染による特異な構築物を他の細胞構造物と明瞭に区別して見い出すことが困難であった。

人工感染ニジマスの電顕像

まず供試魚の魚体内ウィルス量を Table 15 に示した。電顕観察に供試したニジマスではウイルス接種後2日目から発症が見られ始め，2.5日目に取り上げた3尾はいずれも10^5 $TCID_{50}$/g以

Table 15. Virus infectivity of the rainbow trout employed for ultrastructural observation, infected with HRV (dose: $10^{6.30}TCID_{50}$/fish) by intraperitoneal injection.

Fish No.	Days post infection	Virus titer (log $TCID_{50}$/g)
1		3.80
2	1	4.05
3		5.80
4		3.80
5	2	5.55
6		4.30
7		5.05
8	2.5	6.80
9		5.30
10		5.05
11	3	2.80
12		5.30
13		4.80
14	4	3.55
15		5.05
16		≦1.80
17	5	4.55

上と比較的高いウイルス感染価を示した。

ウィルス接種後1日目から5日目までの全個体の腎臓を対象に電顕観察を行なったが，ウイルス接種後1，2日目の供試魚の腎臓組織の細胞は対照群と比較して特に変化は見られず，ウィルス粒子も認められなかった。魚体内ウイルス感染価が比較的高い価を示した2.5日目の個体では3尾中2尾，3日目の個体では3尾中1尾の造血組織にウイルスの出芽像が認められた。特に2.5日目の魚体内ウィルス感染価が$10^{6.80}$ $TCID_{50}$/gと最も高かった個体では多くのウィルス粒子が観察された。ウイルスの出芽像は細網細胞膜や膜上の突起状構造物の表面（Plate 26, Figs.130,131; Plate 27, Figs.132～135）にみられた。ウイルス粒子は大きさ約80×180nmの砲弾型を示していたが，粒子の形態保持の程度は良好ではなかった。ウイルス接種後4，5日目では壊死崩壊が著しく，ウイルス粒子は確認できなかった。

考　　察

自然発症ヒラメおよび人工感染ニジマスでは，共に標的臓器である腎臓の造血組織中の細網細胞の膜表面上にウィルス粒子の出芽像が確認され，HRVは造血組織が増殖場所であることが電顕像からも明らかとなった。またHRVはヒラメおよびニジマス感染魚の腎臓組織中で粒子を観察することが難しく，観察されたウイルス粒子も形態の保持が良好ではなかった。細胞膜表面に出芽して増殖するタイプのラブドウィルスは生体内で浸透圧や生体内に存在する酵素などの影響を受けて，変性し易いと考えられ，粒子の構造が脆いウイルスは長期間生体内で形態を保持することが難しいと推察される。同じ魚類病原ラブドウイルスであるIHNVおよび

VHSV の in vivo でのウイルス粒子の観察では AMEND and CHAMBERS (1970) が IHNV を人工感染させたギンザケ稚魚の頭腎，脾臓，幽門垂，膵臓，肝臓の電顕観察を行い，頭腎の造血組織および脾臓の脾髄部および幽門垂や膵臓の結合組織中に大きさ90×158nmの明瞭なウイルス粒子を多数観察している。一方 VHSV では OZEL and SCHWANZ-PFITZNER (1975) が自然発症魚および人工感染魚の腎臓，脾臓等の電顕観察を行なったがウイルス粒子を観察することが出来できなかったと報告している。また AMLACHER *et al*. (1980) はニジマスに VHSV を人工感染させ，激しい症状を示した病魚10尾の腎臓の電顕観察を行なったところ２尾には大きさ55～68×166～216nmのウイルス粒子が観察されたが，残り８尾には蛍光抗体法によりウイルスの存在が確認されているものの，ウイルス粒子は観察されなかったと報告している。これらの報告から HRV 粒子は VHSV と同様 IHNV に比して形態変化が起き易いものと推察された。

しかし，HRV 人工感染ニジマスの腎臓では造血組織の細網細胞の細胞膜上に前節の in vitro での HRV 感染 RTG　２細胞の観察において見られたような突起状の構造物が観察され，その表面にはウィルス粒子の出芽像が認められた。この様な突起状構造物は IHNV や VHSV では報告例がなく HRV 独自の構造物であることが示唆された。

第Ⅳ章　HRV の防除対策の検討

前章までに HRV はヒラメおよびニジマスに対して強い病原性を有し，今後ヒラメ養殖場のみならずサケ・マス養殖場においても HRV の伝播に充分に留意する必要のあることが示唆された。

しかし，ウイルス性疾病に関しては効果的な治療法がなく，病原体の伝播防止等，防疫に頼らざるを得ない現状にある。魚類病原ラブドウイルスの防疫対策としては，幼稚魚の飼育水温を調節する方法（AMEND 1970）をはじめ，ワクチンの開発（AMEND 1976，FRYNER *et al*. 1976，福田ら1989）や化学療法剤（HASOBE and SANEYOSHI 1985a，b，木村ら1987）の検討等の研究が為されている。ワクチンに関しては IHNV の弱毒化生ワクチンの開発およびその有効性に関する二，三の報告がみられているものの（FRYER *et al*. 1976, AMEND 1976, 福田ら1989），開発に要する時間，他魚種への安全性や遺伝学的な安定性の面から実現にはまだ問題が残されている。一方，飼育水温の調節に関しては IHN の場合，18～20℃と水温が高くなるにつれ死亡率が減少すること，また VHS では自然発症例の水温の上限が15℃付近であり，人工感染試験では飼育水温が高いほど魚体内ウィルスの残存期間および量が減少すること等が報告され（GHITTINO 1965，AMEND 1970，JØRGENSEN 1982，CASTRIC and DE KINKELIN 1984），水温制御の有効性が示唆されている。また，現在最も効果的でかつ広く用いられている方法は卵をポピドンヨード剤により消毒し，その後ウイルスフリーの環境下で飼育するいわゆる二段階方式であり（AMEND and PASCHO 1972, MULKAHY 1983，木村ら1989），我国でも市販のヨード剤（イソジン；有効ヨード　１％）による卵の消毒（50ppm 15分）が一般的に行なわれ効を奏して

いる。また吉水ら（1986）は紫外線照射によるウイルス不活化効果を明らかにし，IHNV 汚染水の紫外線処理による不活化および同処理水を用いたニジマスの飼育例を報告している（YOSHIMIZU *et al*. 1990）。

ところで前章までに HRV の自然発症例では兵庫県下の2例の場合，水温は 6 ～18℃，北海道の場合は 2 ～12℃，また香川県下の例でも 8 ～16℃といずれも水温が15℃前後まで上昇すると自然終息する傾向がみられ，HRV 感染発症に水温が大きな影響を及ぼしていることが示唆された。そこで本節ではまず第1節で水温制御による HRV 感染症の予防法を確立するため HRV の人工感染に及ぼす水温の影響について検討し，第2節では飼育環境，器具および器材の HRV 汚染防止ならびに親魚から卵へのウイルス伝播防止策の確立を目指し，紫外線および各種消毒剤の HRV 不活化効果を検討した。

第1節　HRV 感染発症に及ぼす水温の影響

HRV 感染症の自然発病例では水温が15℃前後まで上昇すると自然終息する傾向がみられ，水温が HRV 感染発症に影響を及ぼすものと推察された。同じ魚類病原ラブドウィルスの IHNV や VHSV の感染発症にも水温が大きく影響していることが報告されている（AMEND 1970，JØRGENSEN 1982）ことから，本節では HRV 感染症の防除対策確立の基礎として HRV 感染発症に及ぼす水温の影響を検討した。

材料と方法

供試魚

1985年11月にヒラメ1年魚（体長11.9～19.7cm，平均体長16.1cm，体重12～73g，平均体重44.3g）50尾を，北海道泊町の養魚場から北海道大学水産学部構内の実験水槽中に設けた飼育水槽に移し，1群を10尾として5群に分け，水温を 5，10，15および20℃として飼育した。対照群はいずれも一週間予備飼育後実験に供した。なお，飼育装置は多量の海水の入手が困難であったことより循環水方式とした。飼育水槽は，50m*l* 容の大型プラスチックコンテナを用い，上面ろ過装置を設置した。水温の調節はヒーターとクーラーを併用して，水温を各温度とも±1℃になるように設定した。

供試ウイルス

供試ウイルスとしては HRV8401-H 株を用い，RTG-2 細胞で培養後，バイアルチューブに分注し，実験に供すまで－80℃に保存した。なお保存したウィルス液の感染価は$10^{6.30}$ $TCID_{50}$/m*l* であった。

人工感染実験法

人工感染実験は腹腔内接種法によった。MS-222で麻酔後，$10^{5.30}$ $TCID_{50}$/尾となるようあらかじめ調製してあったウィルスを0.1mℓ宛腹腔内に接種し，15日間経過を観察した。対照群は MEM_{10} で同様の処理を行った。

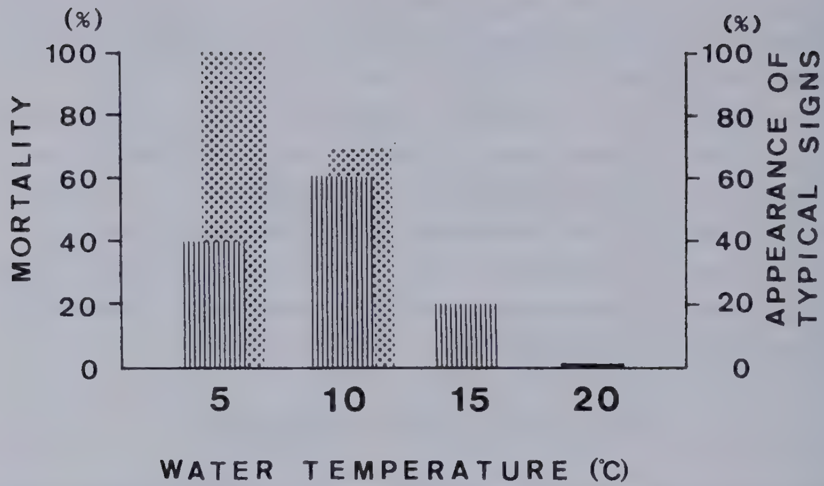


Fig. 9. Effect of water temperature on cumulative mortality and appearance of the typical signs of disease in the hirame after 15 days of artificiail infection with HRV; dose,I.P.$10^{5.30}$ $TCID_{50}$/fish.
||||||||||: Dead fish.
∴∴∴: Fish showing the typical sign.

細菌およびウィルス検査法

供試魚を無菌的に開腹した後，腎臓組織を一白金耳量２％塩化ナトリウム加トリプトケースソイ寒天培地に接種し，25℃で１週間培養し細菌感染の有無を観察した。次いで腎臓，脾臓を摘出し，10倍量の Hanks 液を加えストマッカーを用いてホモジナイズし，ミリポアフィルターHA（0.45μm）で濾過し，ウイルス検査試料とした。ウィルス感染価は，第II章第１節で述べた RTG-２細胞を用いた常法の96穴マイクロプレート法により測定した。なお分離ウィルスの同定は，抗 HRV（8401-H）家兎血清による中和試験によった。

病理組織標本の作成法

各試験群の瀕死魚，観察終了時の生残魚（以下生残魚）の腎臓および脾臓を摘出し，第Ｉ章第２節と同様の方法に従い病理組織標本を作製した。

電顕標本の作成

５℃試験群の瀕死魚の腎臓を細切し，第III章第２節と同様の方法に従い電顕標本を作成し，日立製電子顕微鏡H-7000を用いて75kvで観察した。

血中中和抗体価の測定法

供試魚血清の倍々希釈液列を Hanks 液で作成し，96穴マイクロタイタープレートに50μl 宛１希釈につき４穴に分注後，200$TCID_{50}$/50μl/穴に調製した HRV を加え，15℃で60分間反応させた。対照には，血清のかわりに Hanks 液を50μl 加え混合した。次いで MEM_{10}で1.0×10^5/mlに調製した RTG-２細胞を各穴に100μl ずつ分注し，15℃で10日間培養し，常法により ND_{50}を求めた。

Table 16. Results of virus reisolation from hirame injected with HRV.

Exp. group	Water temp.(℃)	Fish No.	Fish condition	Virus titer (log $TCID_{50}$/g)
Control	10	1	N*1	<1.80
		2	N	<1.80
		3	N	<1.80
		4	N	<1.80
		5	N	<1.80
		6	N	<1.80
		7	N	<1.80
		8	N	<1.80
		9	N	<1.80
		10	N	<1.80
Test	5	1	D*2	≧8.80
		2	M*3	≧8.80
		3	M	7.30
		4	D*4	7.30
		5	S	≧8.30
		6	S	8.30
		7	S	8.05
		8	S	≧8.80
		9	S	≧8.80
		10	S	8.30
Test	10	1	D	7.05
		2	D	6.80
		3	D	7.80
		4	M	5.80
		5	D	6.05
		6	M	5.80
		7	N	<1.80
		8	N	<1.80
		9	N	<1.80
		10	S	5.30
Test	15	1	D	<1.80
		2	D	<1.80
		3	N	<1.80
		4	N	<1.80
		5	N	<1.80
		6	N	<1.80
		7	N	<1.80
		8	N	<1.80
		9	N	<1.80
		10	N	<1.80
Test	20	1	N	<1.80
		2	N	<1.80
		3	N	<1.80
		4	N	<1.80
		5	N	<1.80

*1, N:Normal fish. *2, D:Died fish. *3, M:Moribund fish
*4, S:Diseased fish (survived).

血球染色

血液約50μlをスライドグラスに広げて風乾し，血球の薄層塗抹標本を作成してメイ・グリュンワールドギムザ染色を施し光顕で観察した。

ヘマトクリット値の測定

瀕死魚および生残魚を水槽より取り上げ，尾柄部を切断し，ヘマトクリット管（テルモ）に採血した。ヘマトクリット管は10,500rpm 5分間遠心し，ヘマトクリットリーダーにて全血液量に対する赤血球量の百分率を測定した。

結　　果

累積死亡率

HRV 腹腔内接種15日目の各水温における供試魚の累積死亡率をFig. 9に示した。なお，病理組織標本作成の為に取り上げた瀕死魚も死亡試験群尾数に含めた。5℃は，他の試験群と比較し当初から動作が緩慢で，発症による遊泳動作の変化等の観察が困難であった。10日目ごろに発症が観察され11日目に3尾が死亡した。さらに13日目に1尾が死亡し，累積死亡率は40%に達した。生残魚にも発症がみられ，観察終了時の累積死亡率は変わらなかったものの残りの個体全てにも筋肉内出血，体色黒化，生殖腺の発赤，腹水貯留などの著しい症状が観察された。10℃試験群では4～5日目に発症が認められ，背側，腹側の体側筋中に出血のある個体が観察された（Plate 28, Figs.136,137）。発症個体は，体色が黒化し，動作が緩慢となり，水底に静止したり水面近くをフラフラ遊泳するといった異常遊泳が観察された。6日目に1尾，8日目に3尾さらに10日目に2尾死亡し累積死亡率は60%に達した。なお実験最終日でさらに1尾に発症が認められた。15℃試験群では5日目に1尾さらに13日目に1尾が死亡し，累積死亡率は20%となったが，いずれの個体にも症状は認められなかった。20℃試験群では，観察期間を通じていずれの個体にも変化はみられなかった。

魚体内ウィルス量

供試魚の魚体内ウィルス量の測定結果を Table 16 に示した。5℃試験群において死亡魚は$10^{7.30}$～$10^{8.80}$ $TCID_{50}$/g，瀕死魚で$10^{7.30}$～$10^{8.80}$ $TCID_{50}$/g以上，さらに生残魚でも$10^{8.05}$～$10^{8.80}$ $TCID_{50}$/g以上と高い価を示し，死亡魚，瀕死魚，生残魚のいずれも魚体内ウィルス量に大差は認められなかった。10℃試験群では瀕死魚の場合$10^{5.80}$ $TCID_{50}$/g，死亡魚では$10^{6.05}$～$10^{7.80}$ $TCID_{50}$/gと高い値を示したが，生残魚では発症した個体で$10^{5.30}$ $TCID_{50}$/gであったのに対し，無症状の個体からはウィルスは分離されなかった。また15℃，20℃試験群ではウイルスは分離されなかった。5℃試験群および10℃試験群の各尾の腎臓より分離したウィルスは，抗 HRV 家兎血清による中和試験によって HRV であることが確認された。

細菌検査

TSA 培地を用いた細菌検査の結果，対照群，5，10，15，20℃試験群いずれの供試魚の腎臓からも細菌は分離されなかった。

病理組織学的検討結果

腎臓：

5℃試験群の発症魚の腎臓を Plate 29, Figs.140,141 に示した。HRV 感染症の特徴である造血組織の充出血や壊死が瀕死魚，生残魚全てに観察された。さらに瀕死魚では腎臓の造血組織全域にわたり明かな核の膨化が引き起こされていた。

10℃群の瀕死魚の腎臓の病理組織像を Plate 29, Figs.142,143 に示した。10℃試験群の瀕死魚は，5℃試験群に比べ壊死部が小規模であり，血管の充血も比較的少なく，組織全体におよぶ壊死は認められなかった。ウィルスが分離され軽度の症状が認められた個体では，組織内に若干の出血がみられるものの造血組織に変化は認められなかった。生残魚のうち発症が認められずウィルスも分離されなかった個体では，対照群と比較して特異的な病変は観察されなかった（Plate 30, Figs.144,145)。

15℃，20℃試験群では，対照群と比較して変化は認められなかった（Plate 30, Figs.146～149)。なお，20℃試験群では全個体に黒色大食細胞の増加が観察された（Plate 30, Figs.148,149)。

脾臓：

5℃試験群の瀕死魚の脾臓の病理組織像を Plate 31, Figs.152,153 に示した。脾臓にも著しい出血像が観察され血海を呈していた。特に脾髄では著しい壊死巣の形成が認められた。また腎臓の造血組織と同様に核の膨潤が部分的に観察された。生残魚においても同様の所見が見られたが脾髄組織中の一部分に正常と考えられる組織を残している個体もみられた。

10℃試験群の瀕死魚の脾臓では英動脈の血管壁の融解，脾髄組織の壊死が起こっているものの5℃試験群に比べさほど顕著ではなかった（Plate 31, Figs.154,155)。生存魚のうち発症しなかった個体では血管壁の融解が若干見られたものの脾髄組織には顕著な変性は認められず，マクロファージの浸潤像が観察された（Plate 32, Figs.156,157)。

15℃，20℃試験群では，対照群と比較して変化はみられなかったが，15℃，20℃試験群には腎臓同様に黒色大食細胞の増加が観察された（Plate 32, Figs.158～161)。

人工感染ヒラメの腎臓の電顕像

作成標本中のウイルス粒子を見い出すことは困難であったが，供試した腎臓組織内に造血組織の細網細胞の細胞膜や突起状構造物表面に大きさ約80×180nmの砲弾型のウイルス粒子の出芽像が観察された（Plate 33, Figs.162～165)。

血中中和抗体価

各試験群の生残魚の観察終了時における抗 HRV 血中中和抗体価（ND_{50}）は Table 17 に示す通りである。5℃試験群の生残魚で1：10～1：23，10℃試験群で1尾を除き1：32～1：45，15℃試験群では1：14～1：45，20℃試験群では1尾を除き1：32～1：90であり全般的にはさほど高い値は得られなかったが水温の高い試験群でより高い値を示す傾向が観察された。

Table 17. Neutralinzing antibody titers in hirame sera injected with HRV.

Exp. group.	Water temp. (℃)	Fish no.	Neutralizing antibody titer*
Control	10	6	1 : <8
		7	1 : <8
		8	1 : <8
		9	1 : <8
		10	1 : <8
Test	5	8	1 : 16
		9	1 : 23
		10	1 : 10
Test	10	7	1 : 45
		8	1 : 45
		9	1 : <8
		10	1 : 32
Test	15	5	1 : 14
		6	1 : 45
		7	1 : 45
		8	1 : <16
		9	1 : 38
Test	20	1	1 : 32
		2	1 : 91
		3	1 : 45
		4	1 : 45
		5	1 : <16

* ND_{50} VS $10^{2.00}$ $TCID_{50}$/well

ヘマトクリット値

生残魚のヘマトクリット値を Table 18 に示した。対照群の平均が31.1%，5 ℃試験群の発症魚の平均は29.9%，10℃試験群の平均は38.3%，15℃試験群の平均は33.3%，20℃試験群の平均は39.2%であり，5 ℃試験群の発症魚中に対照群に比して19.3%と低い値を示す個体が見られたが，他の群では顕著な傾向は観察されなかった。

血球塗抹標本の観察

血球塗抹標本の観察結果を Plate 34 に示した。5 ℃試験群では発症した生残魚を対象としたが，幼若赤血球が他の群と比較し非常に高い割合で出現した（Plate 34, Fig.168)。の幼若赤血球の増加は 5 ℃群の標本を作成した全個体に観察され，小型のリンパ球様細胞の相対量も比較的多かった。10℃試験群の瀕死魚では小型のリンパ球様細胞，好中球が比較的多く（Plate 34, Fig.169)，発症魚では大型のリンパ球様細胞が多数出現していた（Plate 34, Fig.170)。15℃試験群でも10℃試験群同様に個体差はあるものの小型のリンパ球様細胞と好中球数が著しく増加する傾向を示したが，大型リンパ球様細胞は見られなかった（Plate 34, Fig.171)。 20℃試験群では全く発症が認められなかったのにもかかわらず他の試験群に比しリンパ球様細胞（Plate 34, Fig.172）の顕著な増量が認められ，好中球は全個体ともに若干の増量が観察された。

Table 18. Heamatocrit value (%) of hirame injected with HRV.

Exp. group	Water temp. (℃)	Fish No.	Ht. (%)	Average of Ht. (%)
Control	10	6	38.1	
		7	35.7	
		8	34.4	31.1
		9	24.2	
		10	23.4	
Test	5	8	19.3	
		9	36.6	29.9
		10	33.9	
Test	10	7	37.7	
		8	37.1	38.3
		9	37.4	
		10	41.0	
Test	15	5	32.9	
		6	28.4	
		7	34.9	33.3
		8	30.0	
		9	40.3	
Test	20	1	31.4	
		2	43.1	
		3	48.5	39.2
		4	38.4	
		5	34.7	

考　　察

HRV の in vitro での至適発育温度は15℃～20℃である（KIMURA *et al*. 1986）が，魚体内における 5 ℃での高い増殖量および10℃での速い増殖速度は，生体内での HRV の増殖を考えるうえで，宿主の免疫系の関与等多くの要因を考慮しなければならないと考える。BISSET (1948) や AVTALION *et al*. (1973) は魚類の免疫応答は温度依存性であり低温下での抗体産生能の低下による急速な抗体価の減少を報告している。また魚は低水温下ではストレスを生じるが，WEDEMEYER (1970) はこのようなストレスが魚体の免疫応答を鈍らせていることを報告し，ROBERTS (1975) は一般的には防御反応は水温が高いほど速やかな反応を示すことを述べている。ヒラメの好適水温は21℃とされ（森実 1984），本研究でも各飼育群の血中中和抗体価は 5 から20℃の間では水温が高い方がより高い値を示す傾向が観察され，飼育水温の相違による免疫応答の差が上述の魚体内でのウイルスの感染増殖に関与している可能性が示唆された。

病理組織学的検討結果をまとめて Table 19 に示した。対照群には何らの病変も観察されなかったが，5 ℃群では，第 I 章で述べた自然発症例のヒラメ同様 HRV 感染症の特徴である腎臓の造血組織各所での血管の充出血，細網細胞の核濃縮を伴う壊死，および脾臓での著しい出血

Table 19. Summarized histological findings of hirame reared in different water temperature injected with HRV.

Exp. group	Water temp (℃)	Condition of fish	Histological findings	
			kidney	spleen
Control	10	Healthy fish	normal	normal
Test	5	Moribund fish	necrosis	necrosis
		Diseased fish (survival)	necrosis	necrosis
	10	Moribund fish	necrosis	necrosis
		Diseased fish (survival)	(necrosis)	(necrosis)
		Healthy fish	normal	normal
	15	Healthy fish	normal	normal
	20	Healthy fish	normal	normal

( ) : Not remarkable.

や壊死が瀕死魚，生残魚全てに観察され，腎臓の静脈周囲の組織に著しい核濃縮のみられる個体も存在した。なお瀕死魚の腎臓を対象に電顕観察を行なったところ細網細胞にウイルスの出芽像が認められた。10℃試験群の瀕死魚では5℃試験群に比べ壊死の程度は軽く，発症した生残魚ではその程度は瀕死魚よりさらに軽度であった。10℃試験群の非発症魚，15℃試験群，20℃試験群では腎臓および脾臓組織に変化は認められなかった。また10℃試験群の生残個体には脾臓組織中にマクロファージの浸潤像が見られ，20℃試験群の腎臓および15，20℃試験群の脾臓に黒色大食細胞の増殖と考えられる像が認められた。この黒色大食細胞は色素が酸化還元系を利用した酵素の働きによる生体防御的役割をもつことが指摘されている（EDELSTEIN 1971）。さらに血球塗抹標本の観察で，5℃試験群の個体に明らかな幼若赤血球の増加が観察されたが，発病個体が体の各所に生じた出血や造血組織の壊死による貧血に対応した補修作用であると考えられた。なお，ヘマトクリット値も生残魚を試験対象としたにも関わらず5℃試験群に著しい貧血状態を示す個体が見られている。また小型のリンパ球様細胞が水温の高い群で顕著で，15℃試験群の個体には好中球数が著しく多い個体も認められた。このように病理組織学的には，HRV感染症はウィルスの増殖によって腎臓，脾臓などの組織の破壊が主要な病変であることが明らかとなったが，この組織破壊の程度はリンパ系の細胞性免疫の働きによりある程度左右されているものと考えられ，飼育水温が高い場合，血中中和抗体の産生，マクロファージによる貪食やEDELSTEIN（1971）の指摘する黒色大食細胞の防御的役割，さらに破壊された組織の再生等の活性が高まり発症および死亡にまで至らないのではないかと推察された。同じ魚類ラブドウイルスIHNVとVHSVの人工感染試験における水温の影響について，IHNVの場合AMEND（1970）は12～16℃で飼育したベニサケは高い死亡率を示したが，18～20℃と飼育水温が高くなるにつれ死亡率は減少したと報告している。さらに12℃で感染させた後飼育温度を上昇させた場合，飼育水温の上昇がIHNV防御に有効であることを報告し，抗体産生の他にインターフェロンが関与していることを示唆した。このインターフェロン産生についてはDE KINKELIN and LE BERRE（1974）がIHNV感染ニジマスで報告している。一方VHSに関して

は，一般的に死に至る水温の上限が15℃付近とされ（GHITTINO 1965, DORSON and DE KINKELIN 1974），またJϕRGENSEN（1982）は5～20℃のニジマスの人工感染試験で，飼育水温が低いほど魚体内のウィルスは残存期間が長くかつ分離率が高いものの，15，20℃での飼育個体からはウィルスは分離されなかったと報告し，その理由にインターフェロンの産生を挙げている。DE KINKELIN and DORSON（1973）やDORSON and DE KINKELIN（1974）はVHSV感染ニジマスでのインターフェロンの産生量を検討し，水温が高いほど産生量が多いことを報告している。したがって，HRVに関しても高水温飼育によるウイルス感染症の発症抑制に抗体産生に加えてインターフェロンも関与している可能性が考えられる。

以上より飼育水温が高いほど免疫系その他の防御作用が強まることが考えられ，事実，HRVの感染防除策としては水温を15℃以上で飼育することが効果的であるとの吉水ら（1987），大迫ら（1988b）の報告以来，各地のヒラメ養殖場では15℃以上での飼育が励行され，1988年以降ヒラメでのHRV感染症の発症例はほとんど報告されていない。

第2節　紫外線および各種消毒剤のHRV不活化効果

魚類のウイルス病に対する効果的な治療法は現在までのところなく，その対策としては防疫が基本となっている。HRVの防疫についても感染魚から放出されたウイルスによる飼育用水，飼育器具などの汚染の防止，ウイルスキャリアー親魚から稚魚への伝播の防止等を図る必要がある。

卵および飼育器具等に対する魚類病原ウイルスの消毒に関してはAMEND and PIETSCH（1972）がポリビニールピロリドヨード剤について検討し卵表面の消毒に有効であることを報告している。また井上ら（1990, 1991），片岡ら（口頭発表*）はポピドンヨード剤をはじめ市販の各種の消毒剤によるIHNVおよびIPNVの不活化効果を検討し，常温下ではいずれも公称有効濃度で十分ウイルスは不活化され，中でも片岡ら（口頭発表）はハロゲン系消毒剤および逆性石鹸の塩化ベンザルコニウムは低温下でも有効であることを報告している。さらに吉水ら（1986），YOSHIMIZU *et al*.（1990）は魚類病原ウイルスの紫外線感受性を検討し，二本鎖RNAのIPNVやCSVを除き，ラブドウイルスやヘルペスウイルスは紫外線に強い感受性を有し，IHNV汚染水でも市販の殺菌灯による紫外線処理によりニジマスの飼育が可能であると報告している。本節ではHRVを対象にその紫外線感受性を検討し，ついで市販の各種消毒剤のHRV不活化効果を検討した。

材料と方法

HRVの紫外線感受性

供試ウイルス：紫外線（U.V.）感受性の検討には本稿第Ⅰ章で供試したHRVの8401-H株，

*片岡ひろこ・吉水　守・佐見　学・吉田　隆・木村喬久：魚類病原ウイルスの防疫に関する研究－Ⅵ，各種消毒剤の効果的使用法について．平成元度日本魚病学会春期大会。

8501-Y株，M8501 K株，BS8501-K株の4株および対照にIHNV（ChAb株），IPNV（VR-299株）を供試した。

U.V. 照射装置：U.V.の線源としては市販の紫外線殺菌灯（ナショナル社GL-15型）を用い，U.V.照射量は照度計（トプコン社UVR-254型）による照度の実測値と照射時間から計算した。

紫外線感受性の測定方法：供試したウイルスの培養濾液約0.5mlを直径60㎜の組織培養用プラスチックシャーレ（ペトレイ60㎜，テルモ社）にとり，厚さが2㎜以下になるよう広げ，所定の時間U.V.照射を行なって照射前後のウイルス感染価を測定した。3回の反復実験によりウイルス感染価を90%以上減少させるのに要するU.V.照射量を求めID_{90}として表示した。なおウイルス感染価の測定は前章までと同様RTG-2細胞を用いたマイクロタイタープレート法により行なった。

HRVの各種消毒剤による不活化効果

供試ウイルス：供試消毒剤によるHRVの不活化効果の検討にはHRVの8401-H株を用いた。

供試消毒剤：消毒剤として市販のクレゾール石鹸液（ヤクハン製薬社），塩化ベンザルコニウム（オスバン，武田薬品工業社），ポビドンヨード剤（イソジン，明治製菓社），次亜塩素酸ナトリウム（和光純薬工業社）を供試し，次亜塩素酸ナトリウムの反応停止剤としてはチオ硫酸ナトリウム（関東化学社）を用いた。なおクレゾール石鹸液，オスバンは公称含有物換算，イソジンは公称有効ヨード換算，次亜塩素酸ナトリウムは実測有効塩素量で濃度を示した。

消毒剤の調製：消毒剤およびチオ硫酸ナトリウムはミリポアフィルターHA（0.45μm）で過除菌した後，各消毒剤は所定の濃度に再蒸留水で希釈し実験に用いた。なお次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素濃度はオルトトリジン法で測定した。

消毒剤によるウイルス不活化効果の測定法：供試消毒剤によるウイルス不活化効果の測定は，所定濃度に希釈した消毒剤とHRV希釈液（200～300pfu（plaque forming unit）/ml）を等量混合し0℃，15℃，25℃で30秒および20分間反応させた後，混合液に9倍量のHanks液を加えて消毒剤の細胞毒性を軽減させEPC細胞に接種した。プラーク法はKAMEI *et al*.（1987）の方法に従い，試験群と消毒剤の代わりにHanks液を用いた対照群の出現プラーク数をもとに，試験群のプラーク減少率として表示した。なお次亜塩素酸ナトリウムについては1%（v/v in DW2）チオ硫酸ナトリウム溶液を反応液に添加して反応を停止させた。

結　　果

HRVの紫外線感受性

HRVの紫外線感受性測定結果をTable 20に示した。U.V.照射前のHRV8401-H株培養濾液の感染価は$10^{4.55}$～$10^{5.05}$ $TCID_{50}$/mlであったが200μW・sec/㎠のU.V.を10秒間照射（$2.0\times10^3\mu$W・sec/㎠の照射）することにより$10^{4.05}$～$10^{4.80}TCID_{50}$/mlに減少した。同様にして$4.0\times10^3\mu$W・sec/㎠を照射した場合には$10^{3.80}$～$10^{4.55}TCID_{50}$/mlに減少し，さらに$6.0\times10^3\mu$W・sec/㎠の照射により$10^{2.55}$～$10^{4.30}$ $TCID_{50}$/mlに減少した。これらの結果をもとに供試ウイルスの感染価

Table 20. Susceptibility of HRV strains to ultraviolet (U.V.).

Virus	Strain	U.V. treatment time (sec)	U.V. dosage*1 (μw.sec/cm²)	Titer (log $TCID_{50}$/ml) experiment 1	2	3	ID_{90}*1 <U.V.dosage> (μW.sec/cm²)
HRV	8401 H	0	0	4.55	5.05	4.55	6.0−7.8 x 10^3
		10	2.0 x10^3	4.30	4.80	4.05	
		20	4.0 x10^3	4.05	4.55	3.80	
		30	6.0 x10^3	3.55	4.30	3.55	
	8501 Y	0	0	6.05	5.05	5.30	6.0−7.8 x 10^3
		10	2.0 x10^3	5.80	4.80	5.05	
		20	4.0 x10^3	5.55	4.55	4.80	
		30	6.0 x10^3	5.05	4.30	4.55	
	M-8501 K	0	0	5.05	5.30	−*3	7.8 x 10^3
		10	2.0 x10^3	4.80	5.05	−	
		20	4.0 x10^3	4.55	4.80	−	
		30	6.0 x10^3	4.30	4.55	−	
	BS-8501 K	0	0	5.05	5.05	−	7.8 x 10^3
		10	2.0 x10^3	4.80	4.80	−	
		20	4.0 x10^3	4.55	4.55	−	
		30	6.0 x10^3	4.30	4.30	−	
IHNV	ChAb	0	0	5.05	5.80	5.55	0.6−1.3 x 10^3
		10	1.0 x10^3	3.55	4.30	4.80	
		20	2.0 x10^3	2.05	2.80	2.80	
		30	3.0 x10^3	<1.80	2.05	<1.80	
IPNV	VR-299	0	0	7.30	8.05	7.80	0.5−1.0 x 10^5
		50	5.0 x10^3	7.30	7.05	6.30	
		1'40	1.0 x10^3	6.30	6.30	6.05	
		3'20	2.0 x10^3	3.80	4.30	4.80	

*1: U.V. intensity, 200μW/cm².
*2: U.V. dose showed 90% or more reduction of virus infectivity.
*3: Not tested.

の変化を図示すると Fig.10 の様になり，U.V.照射前後のウイルス感染価を90%以上減少させるのに要するU.V.照射量（ID_{90}）は6.0〜7.8×$10^3$$\mu$W・sec/cm²と測定された。

8501-Y株も照射前が$10^{5.05}$〜$10^{6.05}$ $TCID_{50}$/mlであった感染価が2.0×$10^3$$\mu$W・sec/cm²の照射で$10^{4.80}$〜$10^{5.80}$ $TCID_{50}$/mlに，6.0×$10^3$$\mu$W・sec/cm²の照射で$10^{4.30}$〜$10^{5.05}$$TCID_{50}$/m$l$に減少し，$ID_{90}$は6.0〜7.8$\mu$W・sec/cm²と測定された。さらに M8501-K 株および BS8501-K 株は共に照射前に$10^{5.05}$〜$10^{5.30}$$TCID_{50}$/m$l$であった感染価が，2.0×$10^3$$\mu$W・sec/cm²の照射で$10^{4.80}$〜$10^{5.05}$ $TCID_{50}$/mlに，6.0×$10^3$$\mu$W・sec/cm²の照射で$10^{4.30}$〜$10^{4.55}$$TCID_{50}$/m$l$に減少し$ID_{90}$は7.8×$10^3$$\mu$W・sec/cm²と測定された。

以上供試した HRV 4 株のID_{90}は株間により顕著な差は認められず，いずれも6.0〜7.8×$10^3$$\mu$W・sec/cm²であった。

一方対照に供試した IHNV（ChAb株）では照射前が$10^{5.05}$〜$10^{5.80}$ $TCID_{50}$/mlであった感染価が1.0×$10^3$$\mu$W・sec/cm²の照射で$10^{3.55}$〜$10^{4.80}$ $TCID_{50}$/mlに，2.0×$10^3$$\mu$W・sec/cm²の照射で

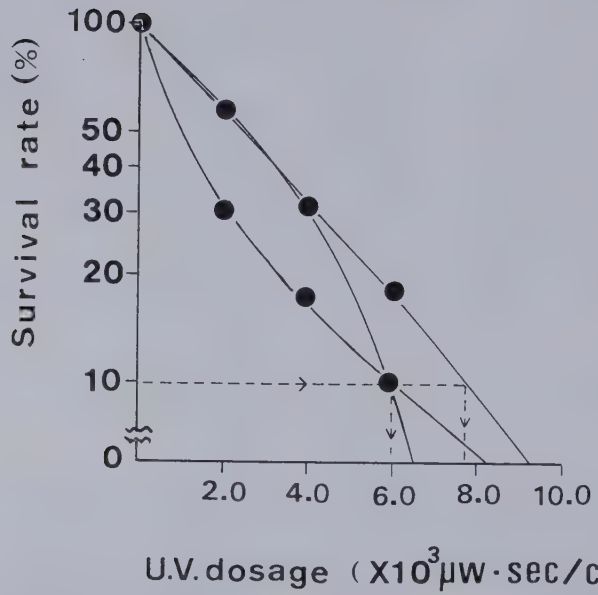


Fig.10. Reduction of HRV (8401 H) infectivity by U.V. irradiation appeard in survival rate (log scale) of virus.

$10^{2.05}$～$10^{4.80}$ $TCID_{50}/ml$ に減少し，ID_{90}は0.6～1.3×$10^{3}\mu W\cdot sec/cm^{2}$と測定された。またIPNV（VR-299株）では照射前が$10^{7.30}$～$10^{8.05}$ $TCID_{50}/ml$であった感染価が5.0×$10^{4}\mu W\cdot sec/cm^{2}$の照射で$10^{7.30}$ $TCID_{50}/ml$に，2.0×$10^{5}\mu W\cdot sec/cm^{2}$の照射で$10^{3.80}$～$10^{4.80}$$TCID_{50}/ml$に減少し，$ID_{90}$は0.5～1.0×$10^{5}\mu W\cdot sec/cm^{2}$と測定された。

消毒剤によるHRVの不活化効果

クレゾール：

クレゾール石鹸のHRV不活化効果をTable 21に示した。HRVのプラーク数を90%以上減少させるのに要するクレゾール石鹸の濃度は，反応温度が0℃の場合は反応時間30秒で500ppm

Table 21. Virucidial activity of saponated cresol solution on HRV.

Temperature (℃)	Time (min)	Plaque reduction (%) Concentration (ppm)					
		5000	1000	500	100	50	10
0	0.5	93	98	97	0	0	1
	20	—	100	100	94	96	78
15	0.5	98	99	99	50	0	0
	20	—	100	100	100	100	96
25	0.5	100	95	97	0	0	0
	20	—	100	100	100	100	96

Table 22. Virucidial activity of benzalkonium chloride on HRV.

Temperature (℃)	Time (min)	Plaque reduction (%) Concentration (ppm)					
		200	100	20	10	2	1
0	0.5	99	72	0	0	9	1
	20	100	100	100	95	14	0
15	0.5	100	99	0	0	2	0
	20	100	100	97	90	0	21
25	0.5	100	97	55	32	8	1
	20	100	100	99	100	72	43

Table 23. Virucidial activity of povidon iodine on HRV.

Temperature (℃)	Time (min)	Plaque reduction (%) Concentration (ppm)*					
		100	20	10	2	1	0.2
0	0.5	100	33	17	11	0	2
	20	—	91	91	49	0	0
15	0.5	97	42	24	21	0	0
	20	—	99	98	74	26	0
25	0.5	95	4	0	6	0	0
	20	—	100	91	72	39	20

*active principle concentration.

以上，また反応時間20分の場合は50ppm以上であり，反応温度が15℃および25℃の場合は，共に反応時間30秒で500ppm以上，反応時間20分の場合は10ppm以上であった。

塩化ベンザルコニウム：

塩化ベンザルコニウムの HRV 不活化効果を Table 22 に示した。HRV のプラーク数を90%以上減少させるのに要する塩化ベンザルコニウムの濃度は，反応温度が 0 ℃の場合は反応時間30秒で200ppm以上，また反応時間20分の場合は10ppm以上であり，反応温度が15℃および25℃の場合は，共に反応時間30秒で100ppm以上，反応時間20分で10ppm以上であった。

ポビドンヨード：

ポビドンヨードの HRV 不活化効果を Table 23 に示した。HRV のプラーク数を90%以上減

Table 24. Virucidial activity of sodium hypochlorite on HRV.

Temperature (℃)	Time (min)	Plaque reduction (%) Concentration (ppm)					
		100	50	10	5	1	0.5
0	0.5	99	96	42	24	25	14
	20	100	100	99	99	72	57
15	0.5	99	98	54	38	26	25
	20	100	100	100	100	73	66
25	0.5	100	97	54	27	18	16
	20	100	100	95	98	74	54

少させるのに要するポビドンヨードの濃度は反応温度に関係なく0℃，5℃および20℃いずれも反応時間30秒で100ppm以上，また反応時間20分で10ppm以上であった。

次亜塩素酸ナトリウム：

次亜塩素酸ナトリウムのHRV不活化効果をTable 24に示した。HRVのプラーク数を90%以上減少させるのに要する次亜塩素酸ナトリウムの濃度は，反応温度に関係なく0℃，5℃および20℃いずれも反応時間30秒で50ppm以上，反応時間20分で5 ppm以上であった。

考　　察

紫外線のHRV不活化効果について検討したところ，分離地の異なる供試4株のHRVの紫外線感受性は株間で差は認められず，ウイルス感染価を90%以上減少させるのに要するU.V.照射量（ID_{90}）は，6.0～7.8×$10^3$$\mu$W･sec/㎠であった。McKelvie and Desantols（1975）や吉水ら（1986）は魚類病原ウイルスのうち，IPNVおよびCSVのU.V.感受性はそのID_{90}が約3.0～9.0×$10^4$$\mu$W･sec/㎠と紫外線に対する感受性が低いものの，IHNV，OMV，*Herpesvirus salmonis*，CCVはそれらのID_{90}が0.3～1.5×$10^3$$\mu$W･sec/㎠を示し，グラム陰性菌の殺菌に要する紫外線照射量（木村ら1976）と同程度であり高い感受性を有することを明らかにしている。本節の結果でも対照として供試したIPNVのID_{90}は0.5～1.0×$10^5$$\mu$W･sec/㎠，IHNVで0.6～1.3×$10^3$$\mu$W･sec/㎠となりMcKelvie and Desantols(1975)や吉水ら（1986）の結果と一致した。したがってHRVの紫外線感受性はIPNV，CSVの約10倍，IHNV，OMV，*H. salmonis*，CCVの約1/5～1/10であることが明らかとなった。市販の一般的な流水式紫外線殺菌装置の公称処理能力における紫外線照射量5.0～6.8×$10^4$$\mu$W･sec/㎠はHRVの$ID_{90}$値の約8倍であり，HRVは同じ魚類病原ラブドウイルスのIHNVに比べ若干紫外線感受性は低いものの，グラム陰性細菌群・魚類ヘルペスウイルス・IHNVと同様に市販の紫外線殺菌装置によって充分不活化できるものと考えられ，飼育用水を汚染したHRVの不活化法として紫外線殺菌法が有効であることが示唆された。

一方，市販の消毒剤のHRV不活化効果を90%以上のプラーク減少率を示す消毒剤の濃度と

Table 25. Minimum concentration of the disinfectants (practical value) showed 90% or more plaque reduction of HRV.

Disinfectant	Time (min.)	Concentration (ppm) Temperature 0 ℃	15℃	20℃
Saponated cresol solution	0.5	500	500	500
	20	50	10	10
Benzalkonium chloride	1.5	200	100	100
	20	10	10	10
Povidon iodine	0.5	100	100	100
	20	10	10	10
Sodium hypochlorite	0.5	50	50	50
	20	5	5	5

して求めたところ（Table 25），公称有効濃度が5000～10000ppm（原液の100～50倍希釈）であるフェノール系消毒剤のクレゾール石鹸液は反応時間が20分の場合15℃および25℃では10ppm以上で効果があり，0℃の場合でも50ppmであった。また，極めて短時間（30秒）の処理でも反応温度に関係なく500ppmの濃度があれば十分であり，クレゾール石鹸液はHRVに対して公称有効濃度の1/10～1/20量で充分なウイルス不活化効果を示した。次に界面活性剤である塩化ベンザルコニウムは，反応時間が20分の場合反応温度に関係なく10ppm以上で有効であり，反応時間が30秒と極めて短時間の処理でも反応温度15℃および25℃の場合100ppm以上で，また0℃でも200ppm以上で効果を示し，公称有効濃度500～1000ppm（原液の200～100倍希釈量）の1/2～1/3程度の濃度で使用すればHRVの不活化に充分効果的であった。さらにハロゲン系の消毒剤，ポビドンヨードと次亜塩素酸ナトリウムは，反応温度に関係なくイソジンの場合反応時間が20分の場合に10ppm，また30秒の場合でも100ppmの濃度で有効であり，次亜塩素酸ナトリウムは反応時間が20分の場合に5 ppm，30秒の場合に50ppmで有効であった。これらは共に公称有効濃度の1/4～1/10の濃度でありイソジンおよび次亜塩素酸ナトリウムでは原液の1000倍の濃度で十分効果的であることが明らかとなった。この様に今回供試した4種の消毒剤はいずれも公称有効濃度よりも低い濃度で充分なHRV不活化効果を示した。しかし，反応時間が30秒の場合，20分の場合より10～50倍の濃度を要したことから，いずれの消毒剤でもできるだけ長く作用させることが望ましいと考えられる。一方，片岡ら（口頭発表）はIHNVやIPNVに対する各種消毒剤のウイルス不活化効果を検討し，ハロゲン系消毒剤およびオスバンは低温（0℃）下でもその効果が維持されていたと報告しいる。HRVでも供試した消毒剤の中ではハロゲン系の消毒剤のイソジンや次亜塩素酸ナトリウムが短時間（30秒）作用させた場合，反応温度に関係なく低温下（0℃）でも比較的低い濃度でHRVの不活化効果を示した。さらに極めて低い濃度，イソジンで2 ppm，次亜塩素酸ナトリウムで0.5ppmでも10%以上のプラーク減少を示したことから，比較的低温下で感染発症を引き起こし伝播するHRVの冬季間，低水温下での消毒にはイソジンまたは次亜塩素酸ナトリウムを使用することがより効果的であると考える。

以上の紫外線および各種薬剤のHRV不活化効果の検討結果から，AMEND and PIETSCH (1972)，MULKAHY (1983)，木村ら (1989)，YOSHIMIZU *et al*. (1990) が提案し，現在サケマスのIHNV防除対策として最も効果的でかつ広く用いられている方法，すなわち発眼初期に卵をヨード剤により消毒し，その後稚魚がウイルスに感受性を示さなくなるまで病原ウイルスフリーの用水あるいは紫外線照射処理をした飼育水等を用いた病原ウイルスフリーの環境下での飼育による二段階方式がHRVについても応用できる可能性が示唆された。しかしヒラメの場合は受精から孵化までの期間が短いことから，消毒時期およびその方法等について今後具体的に検討する必要があると考える。

総　括

沿岸海域での海面養殖事業が盛んになるにつれ養殖魚の疾病被害が増加し，その防除対策が大きな課題となっている。魚類のウイルス性疾病に関しては現在までのところ効果的な治療法がなく，防除対策は予防・防疫に頼るしかない現状にある。

1984年３月の兵庫県淡路島での発生例をはじめ，翌年１月から３月にかけての兵庫県水産試験場，北海道焼尻島および香川県女木島の養殖ヒラメでの発生例はいずれも体表および鰭の充出血，腹部膨満，生殖腺のうっ血，筋肉内出血を主徴とする疾病であった。1984年の兵庫県淡路島，翌年の兵庫県水産試験場での発生例ともに，１月から４月にかけて発生し，この時の飼育水温は６～18℃，累積死亡率は7.2%と25%であった。北海道の場合も発生時期は２月から４月にかけてで，飼育水温は２～12℃，累積死亡率は92%，さらに香川県下の例でも発生時期は２月下旬から４月，飼育水温は８～16℃であり，累積死亡率は3.3%であった。これらの病魚からはいずれもニジマス生殖腺由来細胞（RTG ２）に伝染性造血器壊死症ウイルス（IHNV）と類似の細胞変性効果（CPE）を発現するウイルスが分離された。同様のウイルスは1986年に岡山県および三重県下の養殖ヒラメ稚魚，香川県下の養殖クロダイ，韓国から輸入されたメバルからも分離されている。分離ウイルスはいずれもDNA合成阻害剤であるIUdRによる増殖阻害は認められず，エーテル，酸（pH３）に感受性を有し，ウイルス粒子は80×160～180nmの砲弾型を呈するなど，ラブドウイルスの特徴を示し，KIMURA *et al*.（1986）命名のヒラメラブドウイルス（*Rhabdovirus olivaceus*，HRV）と同定された。

HRV感染症の主な症状は体色の黒化，異常遊泳，腹水の貯留，筋肉中および鰭基部の出血であり，病理組織学的には，腎臓の造血組織の壊死，脾臓の脾髄組織中の細網細胞の核濃縮，核崩壊，核融解を伴う壊死であって既知の近縁の伝染性造血器壊死症ウイルス（IHNV）やウイルス性出血性敗血症ウイルス（VHSV）感染症の諸症状（GHITTINO 1965, YASUTAKE and RASMUSSEN 1968）に共通したものであった。IHNVやVHSV感染症ではニジマスの肝臓に著しい変化が観察されているが，HRV感染症ではヒラメの肝臓にこのような変化はみられなかった。HRV感染症は魚体内各組織に著しい充出血を伴う出血性の敗血症をひき起こし，特に軀幹筋の出血が顕著であった点VHSV感染症に類似している。最近VHSVは海産魚のシーバスやターボットにも病原性を有することが人工感染試験により確かめられているが（CASTRIC and DE KINKELIN 1984），ターボットで観察された症状および組織変化はヒラメのHRV感染症の症状および病理組織像と共通する点が多い。この様にHRVはウイルス学的にも，病理組織学的にもサケ科魚類の病原ラブドウイルスであるIHNVやVHSVに極めて類似していたことからHRVもサケ科魚類に対して病原性を有することが危惧された。

そこで数種のサケ科魚類に対するHRVの病原性を検討した。その結果HRVはニジマスに対しても強い病原性を有することが確認された。また，サクラマスに対してもHRVは病原性を有していることが明かとなったが，累積死亡率や魚体内ウイルス量からニジマスよりも感受性

は低いものと推察された。この様にHRVはヒラメ以外にもサケ科魚類のニジマスやサクラマスに対しても病原性を有することが明らかとなり，今後サケ・マス養殖場におけるHRVの伝播・感染に対して十分留意する必要のあることが示唆された。

ところでIPNVやOMVをはじめ一般に魚類病原ウイルスは主として稚魚期に多大な被害を及ぼし，魚類ラブドウイルスではIHNVやPFRVが稚魚期に被害を与えるウイルスとしてよく知られている。そこでHRVのニジマスに対する病原性を魚体重と接種ウイルス量の両面から検討した。HRVは供試したニジマスの魚体重範囲内（0.2～18.2g）では1尾当りの接種ウイルス量が一定の場合，魚体重の増加と共に病原性の低下が観察されたが，接種ウイルス量を供試魚1g当りで換算した場合，魚体重による差はほとんど認められなかった。一般に稚魚期の魚では生体防御機構としての免疫系が未発達であり，ニジマスでは免疫応答を示すには魚体重が約1g程度にまで成長している必要があるとされている（Amend and Johnson 1981）。魚類病原ウイルスに対する免疫応答としては中和抗体の産生が知られているが，De Kinkelin and Le Berre（1974）はIHNVで，De Kinkelin and Dorson（1973）がVHSVでインターフェロンの産生を報告していることからHRVを感染させたニジマスでも免疫系の他にインターフェロン等の生体防御機構が働き，魚体重に関係なくウイルス感染に対する抵抗力を有するものの，接種ウイルス量を増やすことにより魚体の防御機能が及ばなくなった結果発病するものと推察される。

HRVのニジマスに対する病原性を，同じラブドウイルス科に属しニジマスに強い病原性を有するIHNVと比較検討したところ，HRVの病原性は魚体重が少ない場合にはIHNVより低いものの，魚体重が増加するにつれIHNVとほぼ同程度となることが明らかになり，HRVの病原性は宿主の魚体重による影響を受けにくい点でIHNVと相違していた。ところでIHNVは主に稚魚期に感染し，1年魚で発病する場合は死亡率が低く2年魚では発病しないとされているが（Amend *et al*.1973），VHSVは稚魚から商品サイズ（250～300g）の成魚にまで被害が報告され，罹病する魚体サイズが広範囲に及ぶことが知られている（Ghittino 1965）。したがってこれらの病原性を魚体重の面から類別するとHRVはIHNVよりもむしろVHSVに近い病原ウイルスである可能性が示唆された。

HRV人工感染ニジマスの病理組織像をIHNV人工感染ニジマスの組織像と比較すると，IHNV感染ニジマスでは腎臓および脾臓の壊死が観察され，これらの組織像はHRV感染魚と類似していたが，IHNV感染魚では腎臓・脾臓および筋肉の出血が顕著でなく，肝臓では全個体に壊死や出血が観察された。さらに腸管では粘膜下結合組織や緻密層中のエオシン好性顆粒細胞に核濃縮，核崩壊を伴う細胞壊死が認められた点HRV感染症の組織像と異なっていた。この様にIHNV感染症の特徴とされている緻密層の好酸性顆粒細胞の壊死変性がHRV感染ニジマスでは観察されなかったことから，HRVは病理組織像の面からもIHNVと明瞭に区別された。

ところで魚類病原ラブドウイルスとしてはHRVの他にIHNV，VHSV，PFRV，EVAおよびEVEX等が知られている。HRVの増殖過程および増殖の場を他のラブドウイルスと比較す

る目的で，まずこれらラブドウイルスの in vitro における RTG-2 細胞での増殖過程，増殖様式を検討し，ついで感染魚の臓器内でのウイルス増殖の場およびその様式の検討を行なった。培養細胞においては各ウィルスともに接種後12時間目にウイルス粒子の出芽像が観察された。HRV と IHNV では 8～10時間目に細胞質の電子密度が低下し，ミトコンドリアは電子密度が高くなる特徴を示した。Baroni *et al*.（1982）は VHSV 感染 RTG-2 細胞において，ウイルス接種後 8 時間目に細胞質中に顆粒状繊維構造の束やゴルジ体様の空胞の出現を，また12時間目には顆粒状繊維構造周辺で電子密度の高いリング状構造物および細胞膜表面に中空なウイルス粒子のエンベロープ様構造を観察し，De Kinkelin and Scherrer（1970）もウイルス接種後12時間目に VHSV の出芽像を観察している。この様に HRV を含め魚類ラブドウイルスの多くはウイルス接種後12時間目前後がウイルス粒子の出芽初期と考えられる。なお光顕観察で感染細胞の球形化および核の変性が観察された時期は最も早い EVA，EVEX でも16時間目以降であり，ウイルスの増殖は細胞の形態変化以前に既に始まっていることが明らかとなった。また VHSV で観察されている顆粒状繊維およびリング状構造物はウイルス粒子形成に関与することが指摘されているが，本節で観察した供試ウイルス感染細胞にはこれらの構造物は観察されなかった。ウイルスの出芽期に PFRV，EVEX では電子密度の高い縁で囲まれた中空の竿状および袋状構造物が観察されたが，類似した構造物は VHSV でも観察され，エンベロープのみの空のウイルス粒子とされている。したがって PFRV および EVEX で見られたこれらの構造物も変形した空のエンベロープとも考えられるが，この点に関しては今後さらに検討する必要がある。一方，HRV 感染細胞に比較的電子密度が高く内部に微小繊維構造を持つ突起状の構造物が細胞膜表面上に観察され，その表面に多くのウイルス粒子の出芽像が観察されたが，この突起状構造物は IHNV では極く希にしか観察されず，観察した他のウイルスでは全く見られず VHSV にも報告例がないことから HRV に特徴的なものと考えられた。HRV と同じ *Rhabdovirus* 科 *Lyssavirus* 属の狂犬病ウイルスでは細胞質内に特有な封入体，ネグリ小体を形成することが知られ，HRV 感染細胞の表面に観察された突起状構造物はその表面に多くのウイルス粒子の形成が見られたことから，ネグリ小体の一種である可能性も示唆された。また，現在狂犬病ウイルスの診断に蛍光抗体法や酵素抗体法によるネグリ小体の検出が実施されていることから，この構造物が HRV の迅速診断に応用できる可能性が示唆され，この点に関しても今後さらに検討する必要があると考える。

次に HRV 感染発症魚の臓器内でのウイルス増殖の場およびその様式を検討したが，自然発症ヒラメおよび人工感染ニジマスの腎臓の造血組織中の細網細胞の膜表面上に HRV 感染培養細胞で観察されたウィルス粒子の出芽像と同様な像が観察され，造血組織の細網細胞が HRV の主な増殖場所であると考えられた。特に HRV 人工感染ニジマスの腎臓では造血組織の細網細胞の細胞膜上に in vitro の RTG-2 細胞で見られたような突起状の構造物が観察され，その表面にはウィルス粒子の出芽像が認められた。この様な突起状構造物は IHNV や VHSV 感染魚では報告例がなく HRV に特有の構造物であることが強く示唆された。

ところで HRV はヒラメはもとよりニジマスに対して強い病原性を有し，今後ヒラメ養殖場

のみならずサケマス養殖場においてもHRVの伝播に充分に留意する必要のあることが示唆されたが，ウイルス性疾病に関しては現在までのところ効果的な治療法がなく，病原体の伝播の防止，すなわち防疫に頼らざるを得ない現状にある。魚類病原ラブドウイルスの防疫対策としては，幼稚魚の飼育水温を調節する方法をはじめ，ワクチンの開発や化学療法剤の検討等の研究が為されている。ワクチンに関してはIHNVの弱毒化生ワクチンの開発およびその有効性に関する報告がみられるものの（AMEND 1976 ,FRYER *et al*. 1976 , 福田ら1989），他魚種への安全性や遺伝学的な安定性の面から実現にはまだ多くの問題が残されている。一方，飼育水温に関してはIHNの場合，18～20℃と水温が高くなるにつれ死亡率が減少すること，またVHSでは自然発症例の水温の上限が15℃付近であり，人工感染試験では飼育水温が高いほど魚体内ウィルスの残存期間および量が減少するとされ（JφRGENSEN 1982），水温制御の有効性が示唆されている。また，現在最も効果的でかつ広く用いられている防疫方法は卵をヨード剤により消毒し，その後ウイルスフリーの環境下で飼育するいわゆる二段階方式である。吉水ら(1986)，YOSHIMIZU *et al*.(1990) はU.V.照射によるウイルス不活化効果を明らかにし，IHNV汚染水のU.V.処理による不活化および同処理水を用いたニジマスの飼育例を報告している。HRVの場合も自然発症例ではいずれも水温が15℃前後まで上昇すると自然終息する傾向がみられ，HRV感染発症に水温が重大な影響を及ぼしていることが示唆された。

そこでHRV感染発症に及ぼす水温の影響をHRV人工感染ヒラメの累積死亡率および発症魚の病理組織像より検討した。その結果累積死亡率は飼育水温が低い5℃，10℃でそれぞれ40，60%と高い値を示した。HRVのin vitroでの至適発育温度は15～20℃であったが，魚体内では5℃での高い増殖量，10℃での速い増殖速度および20℃での感染不成立が推察され，生体内でのHRVの増殖を考えるうえで免疫系の関与等多くの要因を考慮しなければならないことが示唆された。事実，生残個体の血中中和抗体価は水温が高い試験区でより高い値を示す傾向が観察され，飼育水温の相違による免疫応答の差が上述の魚体内でのウイルスの感染増殖に関与している可能性が示唆された。病理組織学的には5℃群ではHRVの自然発症ヒラメ病魚と同様にHRV感染症の特徴である腎臓の造血組織での血管の充出血，細網細胞の核濃縮を伴う壊死，および脾臓での著しい出血や壊死が瀕死魚，生残魚全てに観察された。10℃試験群の瀕死魚では5℃試験群に比べ壊死の程度は軽く，発症した生残魚ではその程度は瀕死魚よりさらに軽度であった。10℃試験群の非発症魚，15℃試験群，20℃試験群では腎臓および脾臓組織に変化は認められなかった。また，10℃試験群の生残個体には脾臓組織中にマクロファージの浸潤像が見られ，20℃試験群の腎臓および15，20℃試験群の脾臓に黒色大食細胞の増殖と考えられる像が認められた。さらに血球塗抹標本の観察で，5℃試験群の個体に明らかな幼若赤血球の増加が観察されたが，これは発病個体が体内の各所に生じた出血や造血組織の壊死による極度の貧血に対応した補修作用であると考えられた。また，小型のリンパ球様細胞が水温の高い群で顕著に観察され，15℃試験群の個体には好中球数が著しく多い個体も認められた。このようにHRV感染症はウィルスの増殖によって腎臓，脾臓などの組織の破壊が主要な病変であることが再確認されたが，飼育水温が高い場合，血中中和抗体の産生，マクロファージによる貪食

や黒色大食細胞の防御的役割，さらに破壊された組織の再生等の活性が高まり発症および死亡にまで至らないのではないかと推察された。IHNV と VHSV の人工感染試験における水温の影響について，IHNV では飼育水温の上昇が IHNV 防御に有効であるとされ，抗体産生やインターフェロンの関与が示唆されている（AMEND 1970）。また VHSV に関しては，一般的に感染魚の死に至る水温の上限が15℃付近とされ，人工感染試験でも15，20℃での飼育個体からはウィルスは分離されず，その理由としてインターフェロンの産生が挙げられている（JØRGENSEN 1982）。したがって，HRV に関しても高水温飼育によるウイルス感染症の発症抑制に免疫応答に加えてインターフェロンも関与している可能性が考えられた。この様にヒラメの飼育水温が高い場合免疫系その他の防御作用が強まることが考えられ，HRV の防疫対策として飼育水温の制御，すなわち15℃以上での飼育が有効であることが明らかとなった。

一方，HRV の伝播防止対策として感染魚から放出されるウイルスによる飼育用水，飼育器具などの汚染の防止を計る必要が考えられる。そこで HRV を対象にその紫外線感受性を検討し，ついで市販の各種消毒薬の HRV 不活化効果を検討した。まず紫外線の HRV 不活化効果については，供試した分離地の異なる 4 株の HRV の紫外線感受性は株間で差が認められず，ウイルス感染価を90％以上減少させるのに要する U.V.照射量（ID_{90}）は，$6.0\sim7.8\times10^3\mu W\cdot sec/cm^2$であった。魚類病原ウイルスの IPNV および CSV の U.V.感受性はそのID_{90}が約$3.0\sim9.0\times10^4\mu W\cdot sec/cm^2$，IHNV，OMV，*Herpesvirus salmonis*，CCV では$0.3\sim1.5\times10^3\mu W\cdot sec/cm^2$とグラム陰性菌と同程度であるとされている（MCKELVIE and DESANTOLS 1975，吉水ら1986）。したがって HRV の紫外線感受性は IPNV，CSV の約10倍，IHNV，OMV，*H. salmonis*，CCV の約1/5～1/10であり，市販の流水式紫外線殺菌装置の公称処理能力における紫外線照射量$5.0\sim6.8\times10^4\mu W\cdot sec/cm^2$は HRV の$ID_{90}$値の約10倍であり，HRV は IHNV に比べ若干紫外線感受性は低いものの，市販の紫外線殺菌装置によって充分不活化できるものと考えられる。

つぎに市販の消毒剤の HRV 不活化効果を90％以上のプラーク減少率を示す消毒薬の濃度として求めたところ，公称有効濃度が5000～10000ppm（原液の100～50倍希釈）であるフェノール系消毒剤のクレゾール石鹸液は HRV に対して公称有効濃度の1/10～1/20 量でウイルス不活化効果を示し，界面活性剤であるオスバンは，公称有効濃度500～1000ppm（原液の200～100倍希釈量）の1/2～1/3程度の濃度，さらにハロゲン系の消毒剤であるイソジンと次亜塩素酸ナトリウムは反応温度に関係なく反応時間が20分の場合に 5 ～10ppm，また30秒の場合でも50～100ppmの濃度で有効であった。これらは共に公称有効濃度の1/4～1/10の濃度でありイソジンおよび次亜塩素酸ナトリウムでは原液の1000倍の濃度で効果があることが明らかとなった。この様に本研究で供試した 4 種の消毒剤はいずれも公称有効濃度よりも低い濃度で充分な HRV 不活化効果を示した。ところで片岡ら（口頭発表）は IHNV や IPNV に対する各種消毒剤のウイルス不活化効果を検討し，ハロゲン系消毒剤およびオスバンは低温（0℃）下でもその効果が維持されていたと報告しいる。HRV でも供試した消毒剤の中ではハロゲン系の消毒剤のイソジンや次亜塩素酸ナトリウムが，反応温度に関係なく低温（0℃）下でも比較的低い濃度で HRV の不活化効果を示したことから，比較的低温下でも感染発症を引き起こすことが

可能なHRVの消毒にはイソジンまたは次亜塩素酸ナトリウムを使用することがより効果的であると考える。

以上本研究ではHRV感染症においては腎臓，脾臓の壊死および出血，筋肉の出血を主特徴とし，サケ科魚類に対する病原性の検討でニジマスに対しても病原性を示すなどVHSV感染症と多くの点で共通することが明らかとなった。さらにVHSVでは，サケ科魚種の他のウィルス病とは異なり体重が200～300gのニジマスの成魚においても感染し被害を及ぼすことが知られているが，HRVも自然発生例で体重100～700gのヒラメにも感染し，人工感染試験ニジマスに対しても魚体重18gの供試魚に強い病原性を示し，感染し得る魚体サイズの点でもHRVとVHSVは類似していた。HRV感染症がVHSVと類似し，特にニジマスなどのサケ科の魚類にも病原性を有することが確認されたことおよびHRVがヒラメは勿論クロダイをはじめ多くの海産魚にも病原性を有することが明らかにされており，HRVは養殖魚類において今後十分注意する必要があるウイルスと考えられる。

最後に本研究ではHRVの防除対策を検討し，水温の制御によりHRV感染発症の抑制が可能であることを明らかにし得た。事実，HRVの感染防除策としては水温を15℃以上で飼育することが効果的であるとの吉水ら（1987），大迫ら（1988b）の報告以来，各地のヒラメ養殖場では15℃以上での飼育が励行され，1988年以降ヒラメでのHRV感染症の発症例はほとんど報告されていない。今後は本研究で得られた成果を基礎にしてHRV感染症を未然に防止する具体的方法の確立を計ると共に，ワクチンの開発やインターフェロンの応用を検討してゆく必要があると考える。

要　　約

本研究では養殖ヒラメに発生した新種の病原ウイルス *Rhabdovirus olivaceus*（hirame rhabdovirus：HRV）による感染症の発症過程，発病機構を病理組織学的に究明し，かつ感染防除対策の基礎を確立することを目的に種々の検討を行なった。

まずヒラメのHRV感染症の発生経過およびHRV感染ヒラメの病理組織像を検討した。1984年3月の兵庫県での発生例をはじめ，翌年1月から3月にかけての兵庫県，北海道および香川県の養殖ヒラメでの発生例はいずれも体表および鰭の充出血，腹部膨満，生殖腺のうっ血，筋肉内出血を主徴とする疾病であった。飼育水温は2～18℃，罹病魚の魚体重は100～700g，累積死亡率は3.3%～92%，いずれの場合も水温が15℃前後まで上昇すると自然終息する傾向がみられた。また病魚からはRTG-2細胞にIHNVと類似の細胞変性（CPE）を発現するウイルスが分離されたが，これらのウイルスの性状はラブドウイルスの特徴を示し，KIMURA *et al*.（1986）命名のヒラメラブドウイルス（*Rhabdovirus olivaceus*，HRV）と同定された。HRVにおいて自然発症したヒラメ病魚の病理組織像を検討したところ，腎臓の造血組織や脾臓の脾髄組織に著しい壊死や出血が認められた。さらに体側筋繊維間および精巣，卵巣の間質組織中に

充・出血が，また消化管の粘膜層および筋層中にも出血が観察された。

数種のサケ科魚類に対するHRVの病原性を検討したところ，腹腔内接種法ではニジマスが55％と高い死亡率を示し，死亡魚からは高いウィルス感染価が得られた。次ぎにHRVとIHNVのニジマスに対する病原性を比較検討したところ，HRVでは供試したニジマスの魚体重範囲内（0.2～18.2g）で接種ウイルス量を供試魚1g当りで換算した場合，死亡率に魚体重による影響はほとんど認められなかった。一方IHNVではニジマスの魚体重の増加と共に病原性が低下し，両ウイルスの病原性に差が認められた。HRV感染ニジマスの組織像をIHNV感染ニジマスの組織像と比較すると，腎臓および脾臓の壊死像は両ウイルス感染魚共に類似していたが，IHNV感染症の特徴とされている腸管の緻密層の好酸性顆粒細胞の壊死変性がHRV感染魚には観察されなかったことから，病理組織像の面からも両ウイルス感染症は明瞭に区別された。

HRVの増殖過程および増殖の場を知る目的で，まず魚類病原ラブドウイルス，HRV，IHNV，PFRV，EVA，EVEXのin vitroにおけるRTG-2細胞での増殖過程，増殖様式を検討した。RTG-2感染細胞では各ウィルスともに接種後12時間目にウイルス粒子の出芽像が観察され，HRV感染細胞の細胞膜表面には電子密度が高く内部に微小繊維構造を持つ突起状の構造物とその表面にウイルス粒子の出芽が観察された。つぎにヒラメおよびニジマスの腎臓の電顕観察を行い，造血組織中にウィルス粒子の出芽像を観察し，ここがHRVの主な増殖場所であると考えられた。特にHRV人工感染ニジマスの腎臓では細網細胞上にRTG-2感染細胞で見られた様な突起状の構造物が観察され，この構造物はHRVに特有であることが示唆された。

HRVの防除対策としてまずヒラメのHRV感染発症に及ぼす水温の影響を検討したところ，5，10，15，20℃試験群でそれぞれの累積死亡率は40，60，20，0％を示し，発症個体にはHRV特有の症状が観察された。病理組織学的には5℃，10℃群で腎臓および脾臓に充出血や壊死が観察されたが，10℃試験群の充出血や壊死の程度は5℃試験群に比べ軽度であった。加えて，10℃試験群の生残個体には脾臓組織中にマクロファージの浸潤像が見られ，20℃試験群の腎臓および15，20℃試験群の脾臓に黒色大食細胞の増殖と考えられる像が認められた。また，血液塗抹標本の観察では，5℃試験群の個体に明らかな幼若赤血球の増加が認められ，水温の高い群ではリンパ系の細胞が顕著に観察された。つぎにHRVを対象にその紫外線感受性および市販の消毒剤による不活化効果を検討したところ，HRVのウイルス感染価を90％以上減少させるのに要するU.V.照射量（ID_{90}）は，$6.0～7.8\times10^{3}\mu W\cdot sec/cm^{2}$であり，消毒剤の濃度はクレゾール石鹸液の場合500ppm（原液の1000倍希釈濃度）以上，塩化ベンザルコニウムでは200ppm（原液の100倍）以上，イソジンと次亜塩素酸ナトリウムはそれぞれ100ppm（原液の1000倍），50ppm（原液の1000倍）以上であった。

謝　　辞

稿を終えるにあたり終始懇篤なる指導と鞭撻を賜った北海道大学水産学部微生物学講座教授木村喬久博士（現北海道大学名誉教授）に深大なる謝意を表すると共に，種々有益な助言と指導を賜った北海道大学水産学部発生学遺伝学講座教授山崎文雄博士，ならびに北海道大学微生物学講座助教授絵面良男博士（現北海道大学教授）に深く感謝申し上げる。また病理組織の観察に際して，有益なる助言を賜った三重大学水産学部助教授宮崎照雄博士に厚くお礼申し上げるとともに，本研究遂行上，適切な助言と指導を頂いた北海道大学水産学部微生物学講座助手田島研一博士（現北海道大学助教授）ならびに吉水　守博士（現北海道大学講師）に心から感謝申し上げる。さらに本稿作製にあたり校閲ならびに指導を賜った水産庁南西海区水産研究所資源増殖部部長森岡泰啓博士，同部魚類増殖研究室室長佐古　浩氏に厚く感謝申し上げる。また研究試料の供与等種々の便宜を戴いた兵庫県水産試験場の五利江重昭氏，香川県水産試験場松本紀男氏および東京水産学部助教授福田穎穂博士にそのご厚情に対し深謝の意を表する。さらに実験上の助言また協力を戴いた北海道大学水産学部微生物講座学生諸氏，南西海区水産研究所資源増殖部主任研究官鈴木伸洋博士にも厚くお礼申し上げる。

文　　献

AMEND,D.F., 1970: Control of infectious hematopoietic necrosis virus disease by elevating the water temperature. *J.Fish Res.Board Can.*,**27**,265-270.

AMEND,D.F., 1976: Prevention and control of viral diseases of salmonids. *J.Fish Res.Board Can.*, **33**,1059-1066.

AMEND,D.F., and V.C.CHAMBERS, 1970: Morphology of certain viruses of salmonid fishes. II. In vivo studies of some viruses causing infectious hematopoietic necrosis. *J. Fish Res.Board Can.*,**27**,1385-1388.

AMEND,D.F., and K.A.JOHNSON, 1981: Current status and further needs of *Vibrio anguillarum* bacterins. In *International symposium on fish biologics,* Serrodiagnostics and Vaccines, Leetown, W.Va.Dev. Biol. Standard, 49pp.403-417.

AMEND,D.F., and J.P.PIETSCH, 1972: An improved method for isolating viruses from asymptomatic carrier fish. *Trans.Amer.Fish Soc.*,**101**,267-269.

AMEND,D.F., W.T.YASUTAKE, and R.W.MEAD,1969: A hematopoietic virus disease in rainbow trout and sockeye salmon. *Trans.Amer.Fish.Soc.*,**98**,796-804.

AMEND,D.F., W.T.YASUTAKE, J.L.FRYER, K.S.PILCHER, and W.H. WINGFIELD, 1973: Infectious hematopoietic necrosis (IHN). In W.A.Dill(ed.) *Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control*. FAO, EIFAC Tech. Rap. No.17, Suppl.2. pp.80-87.

AMLACHER,E., J.UDE, CHRISTIANE RUDOLPH, and G.ERNST, 1980: Direct electron microscopical visualization of the presumptive virus of viral haemorrhagic septicemia (VHS) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and additional histopathological and haematological observations. *J. Fish Dis.*,**3**,55-62.

AVTALIN, R. R., A. WOJDANI, Z. MALIK,R.SHAHRABANI, and M. DUCZYMINER,1973: Influence of environmental temperature on the immune response in fish. *Curr.Topics Microbiol. Immun.*,

61,1-35.

BACHMANN,P.A., and W.AHNE, 1974：Biological properties and identification of the agent causing swimbladder inflammation in carp. *Arch.ges.Virusforsch.*,**44**,261-269.

BARONI,A., R.GALESSO, and G.BOVO, 1982：Ultrastructural observation on the viral haemorrhage septicemia in culture. *J.Fish Dis.*,**5**,439-444.

BELLET,1965：Viral hemorrhagic septicemia (VHS) of the rainbow trout bred in France. *Ann.N. Y. Acad.Sci.*,**126** (Art.1),194-98.

BISSET ,1948：The effect of temperature on antibody production in cold-blooded vertebrates. *J. Pathol. Bact.*, **60**,87-92.

BOOTSMA,1971：Hydrocephalus and red-disease in pike fry (*Esox lucius* L.). *J. Fish Biol.*,**3**,417-419.

CARLISLE K.A.SCHAT R.ELSTON,1979：Infectious heamatopoietic necrosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in a semi-closed (*Salmo gairdneri*) reared in sea-water. *J.Fish.Dis.*,**2**,511-517.

CASTRIC and P.DE KINKELIN, 1980：Occurrence of viral haemorrhagic septicemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) reared in sea-water. *J.Fish.Dis.*, **3**, 21-27.

CASTRIC and P.DE KINKELIN, 1984：Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) to viral haemorrhagic septicemia. *Aquaculture,* **41**, 203-212.

COHEN.J. and G.LENOIR, 1974：Ultrastructure et morphologic de quatre rhabdovirus de poissons. *Ann.Rech.vétér.,* **5** (4), 443-450.

COONS,A.H., and M.H.KAPLAN, 1950：Localization of antigen in tissue cells.II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J.Exp.Med.,* **91**. 1-13.

DARLINGTON,R.W., R.TRAFFORD, and K.WOLF, 1972：Fish rhabdovirus：morphology and ultrastruture of North American salmonid isolates. *Arch. ges. Virusforsh.,* **39**, 257-264.

DORSON,M. and P.DE KINKELIN, 1974：Mortality and Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus：role of temperature. *Ann. Rech.vétér.*, **5**, 365-372.

EDELSTEIN,L.M., 1971：Melanin：a unique biopolymer. In Pathology. Annual, ed.H.L. Ioachim,pp. 309-324.New York：Appleton-Century-Crofts.

EIGER,B., and H.HENTSCHEL, 1983：Glomerular disease in cultured rainbow trout (*Salmo gairdneri*) suffering from presumptive chronic viral haemorrhagic septicemia. *J.Fish Dis.,* **6**, 211-229.

ELGER,B., M.NEUKIRCH, and H.HENTSCHEL, 1986：The kidney of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in the acute phase of viral haemorrhagic septicaemia：in vivo experiments on the renal excretion of fluid, electrolytes and protein. *J.Fish Dis.,* **9**, 381-392.

FIJIAN,N.N., 1968：Progress report on acute mortality of channel catfish fingerlings caused by a virus. *Bull.Off. int.Epizoot.*,**69**,1167-1168.

FIJIAN,N.N., 1972：Infectious dropsy in carp - a disease complex. In *Diseases of Fish*, Proceedings of symposium no.30, Zoological Society, London, May, 1971, ed. L. E.MAWDESLEY-THOMAS, pp. 39-51. New York and London：Academic Press and the Zoological Society.

FIJIAN,N.N., Z.PETRINCE, D.SULIMANOVIC and L.O.ZWILLENBERG, 1971：Isolation of viral causative agent from the acute from of infectious dropsy in carp. *Vet. Arhiv.*,**41**, 125-135.

FRYER,J.L., J.S.ROHOVEC, G.I.TEBBID, J.S.MCMICHAEL, and K.S.PILCHER,1976：Vaccination for control of infectious diseases in Pacific salmon. *Fish Pathol.*,**10**,155-164.

福田穎穂・加藤宜昭・周　信佑・保田義博・佐野徳夫, 1989：IHN弱毒クローニングのニジマス稚魚に対する病原性について。日水誌,**55**(2),267-271.

GHITTINO,P.,1965：Viral hemorrhagic septicemia (VHS) in the rainbow trout in Italy. *Ann.N.Y. Acad.Sci.*, **126**(Art.1), 468-478.

GHITTINO,P., 1973：Viral hemorrhagic septicemia (VHS). In W.A.Dill (ed.) *Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control*.pp.4-11.

五利江重昭・中本幸一, 1986：ヒラメより分離されたウイルスの病原性. 魚病研究, **21**, 177-180.

HASOBE,M., and M.SANEYOSHI, 1985a: A New method for the evaluation of antiviral agents against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) on microtiter plates : CPE spot reduction method. *Bull. Jap. Sci.Soc. Fish.*, **51**,1079-1084.

HASOBE,M., and M.SANEYOSHI, 1985b: On the approach to the viral chemotherapy against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in vitro and in vivo on salmonid fishes. *Fish Pathol.*, **20**,343-351.

井上　潔・安元　進・安永統男・高見生雄, 1986: 養殖トラフグの口白症の病原体分離と復元実験. 魚病研究, **21**, 129-130.

井上　潔・池谷文夫・山崎隆義・原　武史, 1990: IPNウイルスに対する市販消毒剤の殺ウイルス効果. 魚病研究, **25**(2), 81-86.

井上　潔・池谷文夫・山崎隆義・原　武史, 1991: IHNウイルスに対する市販消毒剤の殺ウイルス効果. 魚病研究, **26**(4), 189-194.

井上　潔・山野恵祐・前野幸男・中島員洋・松岡　学・和田有二・反町　稔, 1992: 養殖マダイのイリドウイルス感染症. 魚病研究, **27**(1), 19-27.

JENSENN, M. H., 1963: Preparation of fish tissue cultures for virus research. *Bull. Off. Int. epizoot*, **59**, 131-134.

JØRGENSEN, P. E. V., 1982: Egtved virus : temperature-dependent immune response of trout to infection with low-virulence virus. *J. Fish Dis.*, **5**, 47-55.

KAMEI, U., M. YOSHIMIZU, and T. KIMURA, 1987: Plaque assay of *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *J. Fish Dis.*, **22**(3), 147-152.

KIMURA,T., and T. AWAKURA, 1977: Current status of disease of cultured salmonids in Hokkaido, Japan. In *International Symposium on Diseases of Cultured Salmonids*, Tavolek Inc., Seattle, pp.124.

KIMURA, T., M. YOSHIMIZU, and S. GORIE, 1986: A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame (Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*) and ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Dis. Aquat. Org.*, **1**, 209-217.

KIMURA, T., M. YOSHIMIZU, and M. TANAKA, 1981: Studies on a New Virus (OMV) from *Oncorhynchus masou*-I. Characteristics and pathogenicity. *Fish pathol.*, **15** (3/4), 143-147.

木村喬久・吉水　守・佐見　学・野村哲一, 1989: サケ科魚類の伝染性造血器壊死症 (IHNV) の垂直感染の可能性, 大型別枠研究, サクラマス研究グループレポート, 8, 近海漁業資源の家魚化システムの開発に関する研究 (マリーンランチング計画) プログレスレポート, 北海道さけ・ます孵化場, 9-22.

木村喬久・吉水　守・田島研一・絵面良男・坂井　稔, 1976: 養殖用水の紫外線殺菌について-I. 魚類病原細菌ならびに養魚水中生存菌の紫外線感受性. 日水誌, **42**,207-211.

DE KINKELIN, P., and M. B. LE BERRE, 1974: Necrose hematopoietique infectieuse des salmonides : production d' interferon circulant induite apres l' infection experimentale de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). *C.R.Acad.Sci.Paris*, Serie D, **279**,445-448.

DE KINKELIN,P., and J.CASTRIC, 1982: An experimental study of the susceptibility of Atlantic salmon fry (*Salmo sala* L.) to viral hemorrhagic septicemia. *J.Fish Dis.*, **5**,57-65.

DE KINKELIN,P., and M.DORSON, 1973: Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimenntally infected with Egtved virus. *J.Gen.Virol*, **19**,125-127.

DE KINKELIN,P., and R.SCHERRER, 1970: Le vitus d'Egtved. 1 Stabilité, developement et structure du virus de la souche danois F1. *Annales de Recherche Vétérinaire*, **1**, 17-30.

DE KINKELIN,P., B.GALIMARD, and R.BOOTSMA, 1973: Isolation and identification of the causative organism of "Red Disease" of pike (*Esox lucius* L. 1766). *Nature*, **241**, 465-467.

松里寿彦, 1975: 養殖ハマチのリンホシスチス病について. 魚病研究, **10**,90-101.

MATUMOTO, S., 1962: Electron microscopy of nerve cells infected with street rabies virus. *Virology*, **17**,198.

MATUMOTO,S., L.G.SCHNEIDER., A. KAWAI., and T. YONEZAWA, 1974: Further studies on the replication of rabies-like viruses in or ganized cultures of mammalian neural tissues. *J. Vitol.*,

14,981.

MCKELVIE,R.M., and D.DESANTOLS, 1975: Fish virus-Survival and inactivation of infectious pancreatic necrosis virus. *J.Fish Res.Board Can.*, **32**,1267-1273.

MOROI, K., T. NAKAI, K. MUROGA, M. ARIMOTO, K. MUSHIAKE and I. FURUSAWA, 1992: Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) wiyh nervous necrosis. *Virology*, **187**,368-371.

森実庸男, 1984: ヒラメ養殖に関する基礎的研究－Ⅰ異なった水温で飼育した若年魚の成長. 水産増殖 **32**(3), 127-131.

MULKAHY, D., 1983: Control of mortality caused by infectious haematopoietic necrosis virus. In (ed.by J.C.Leong and T.Y.Barila) proceeding of *viral diseased of salmonid fishes in the Columbia River basin*. Bonnesiville Power Administration, Portland, Oregon. pp.51-81.

MULKAHY, D., and J. WOOD, 1986: A natural epizootic of infectious haematopoietic necrosis virus in imported Atlantic salmon, *Salmo sala* L., reared in the enzootic region. *J.Fish Dis.*, **9**,173-175.

OLBERDING,K.P., and J.W.FROST,1975: Electron microscopical observations of the structure of the virus of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J.gen. Viol.*, **27**,305-312.

大迫典久・吉水　守・木村喬久, 1988a: HRV (Hirame rhabdovirus; *Rhabdovirus olivaceus*) 感染ヒラメの病理組織学的検討. 魚病研究, 23(2), 117-123.

大迫典久・吉水　守・木村喬久, 1988b: *Rhabdovirus olivaceus* (HRV) 人工感染に及ぼす水温の影響. 魚病研究, 23(2), 125-132.

OSEKO,N., YOSHIMIZU,M. and T.KIMURA, 1990: Pathogenicity of *Rhabdovirus olivaceus* (Hirame rhabdovirus; HRV) to hirame and salmonid fish. In *The Second Asian Fisheries Forum*, 1989. 5, The Asian Fisheries Society, Tokyo, Japan, 150-154.

ÖZEL,M., and I.SCHWANZ-PFITZNER, 1975: Vergleichende elektronmikroskopishe Untersuchungen an Rhabdoviren pflanzlicher und tierischer Herkunft.Ⅲ. Egtved-Virus (VHS) der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) und Rickettsienähnliche Organismen. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* Ⅰ. *Originale, A* **230**,1-14.

RASMUSSEN, C.J., 1965: A biological study of the Egtved disease (INuL). *Ann. N.Y. Acad.Sci.* **126** (Art.1),427-460.

ROBERTS . R.J. ,1975 : The effect of temperature on diseases and their histopathological manifestations in fish. In *The Pathology of Fishes*, ed. W.E. RIBELIN and G.MIGAKI, pp.477-496. Madison,Wis.:University of Wisconsin Press.

ROSS,A.I., J.PELNAR, and R.R.RUCKER, 1960: A virus-like disease of chinook salmon. *Trans. Amer. Fish.Soc.*, **89**, 160-163.

RUCKER,R.R., W.J.WHIPPLE, J.R.PARVIN, and C.A.EVANS, 1953: A contagious disease of salmon possibly of virus origin. *U.S. Fish,Wildl.Serv., Fish Bull.* **54**, 35-46.

SANO,T., 1976: Viral diseases of cultured fishes in Japan. *Fish Pathol.*, **10**(2), 221-226.

SANO,T., and H.FUKUDO, 1987: Principal microbial diseases of marinculture in Japan. *Aquaculture*, **67**,59-69.

SANO,T., N.OKAMOTO, and T.NISHIMURA, 1981a: A new viral epizootic of *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel. *J. Fish Dis.*, **4**,127-139.

SANO,T., T.NISHIMURA, N.OKAMOTO, and H.FUKUDA, 1977: Studies on viral diseases of Japanese fishes.Ⅶ. A rhabdovirus isolated from European eel,*Anguilla anguilla*. *Bull.Jap. Sci.Soc.Fish.*, **43**,491-495.

SANO,T., T.NISHIMURA, K.OGUMA, K.MOMOYAMA, and N.TAKENO, 1981b: Bacuro virus infection of cultured kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*)in Japan. *Fish Pathol.*, **15**,185-191.

反町　稔, 1987 : 養殖魚類の種苗生産で影響が危惧されるラブドウイルス, HRV について. FIDIC ニュース, **11**,41-42.

反町　稔・原　武史, 1985: 腹水症を呈するブリ稚魚から分離されたウイルスについて. 魚病研究, **19**,

231-238.

TACK,E., 1959: Beitrege zur Erforschung der Forellenscuche. *Arch.Fishhereiwiss,* **10**,20-30.

WEDERMEYER,G., 1970: The role of stress in the disease resistance of fishes. In *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes*, ed. S.F. Senieszko, Spec. Publ. No.5, pp.30-35. Amer.Fish. Soc.,Washington,D.C. 526pp.

WINGTON,J.R., C.N.LANNAN, J.L.FRYER, and T.KIMURA, 1981: Isolation of a new reovirus from chum salmon in Japan. *Fish Pathol.,* **15**(3/4),155-162.

WOLF.,1966: The fish virus. *Adv.virus Research,* **12**,35-101.

WOLF,K., and M.C.QUIMBY,1969: Fish cell and tissue culture. In *Fish Physiology*, ed.W.S.HOAR & D.J.RANDALL,vol.3,pp. 253-305. New York and London,Academic press.

WOLF,K., and W.G.TAYLAR,1975: Salmonid viruses: a syncytium forming agent from rainbow trout. *Fish Health News,* **4**,3.

WOLF,K., R.L.HERMAN, R.W.DARLINGTON, and W.G.TAYLOR, 1975: Salmonid viruses : effects of *Herpesvirus salmonis* in rainbow trout fry. *Fish Health News,* **4**,8.

YASUTAKE,W.T., 1970: Comparative histopathology of epizootic salmonid virus diseases. In *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes*. ed. S.F. Senieszko, Spec. Publ. No.5,pp.341 350, Amer.Fish.Soc.,Washington.D.C. 526pp.

YASUTAKE,W.T., and D.F.AMEND, 1972: Some aspect of pathogenesis of infectious hematopoietic necrosis (IHN). *J. Fish Biol.,* **4**,261-264.

YASUTAKE,W.T., and C.J.RASMUSSEN, 1968: Histpathogenesis of experimentally induced viral hemorrhagic septicemia in fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull off. Int.Epiz.,* 69, 977-984.

吉水　守・瀧澤宏子・木村喬久 (1986): 魚類病原ウイルスの紫外線感受性. 魚病研究, **21**(1), 47-52.

吉水　守・西沢豊彦・大迫典久・木村喬久, 1987: ヒラメのラブドウイルス病. 魚病研究, **22**(1),54-55.

YOSHIMIZU,M., H.TAKIZAWA, M.SAMI, H.KATAOKA, T.KUGO, and T. KIMURA, 1990: Disinfectant effects of ultraviolet irradiation on fish pathogens in hatchery water supply. In *The Second Asian Fisheries Forum*, 1989. 5, The Asian Fisheries Society,Tokyo,Japan,pp.82-86.

ZWILLENBERG,L.O., M.H.JENSEN, and H.H.L.ZWILLENBERG, 1965: Electron microscopy of the virus of viral hemorrhagic septicemia of rainbow trout (Egtved virus). *Archiv fur die gesamte Virusforschung,* **17**,1-19.

Plate 1. Kidney of diseased hirame

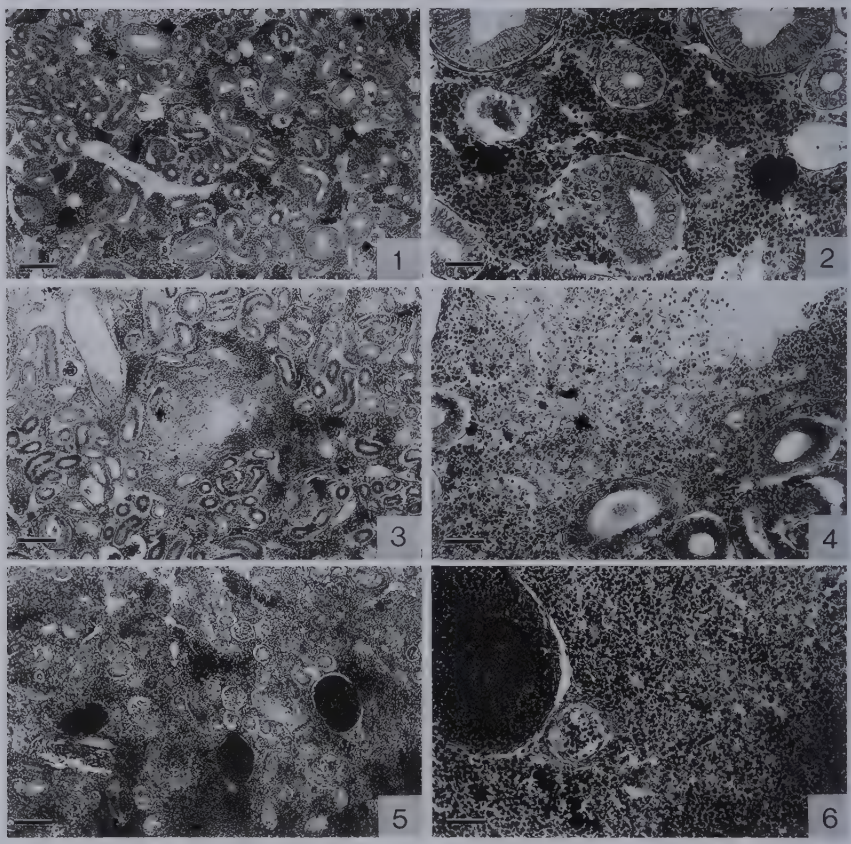


Fig.1. Section of kidney; control fish (bar=100μm).
Fig.2. High magnification of kidney in Fig.1.(bar=25μm).
Fig.3. Section of kidney ; diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, showing the necrosis of hematopoietic cells and hemorrhage in the interstitial lymphoid tissue (bar=100μm).
Fig.4. High magnification of kidney in Fig.3, showing the necrosis of hematopoietic cells (bar=25μm).
Fig.5. Section of kidney; diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100 μm).
Fig.6. High magnification of kidney in Fig.5, showing the hyperemia in the vessel (bar= 25μm).

Plate 2. Spleen of diseased hirame

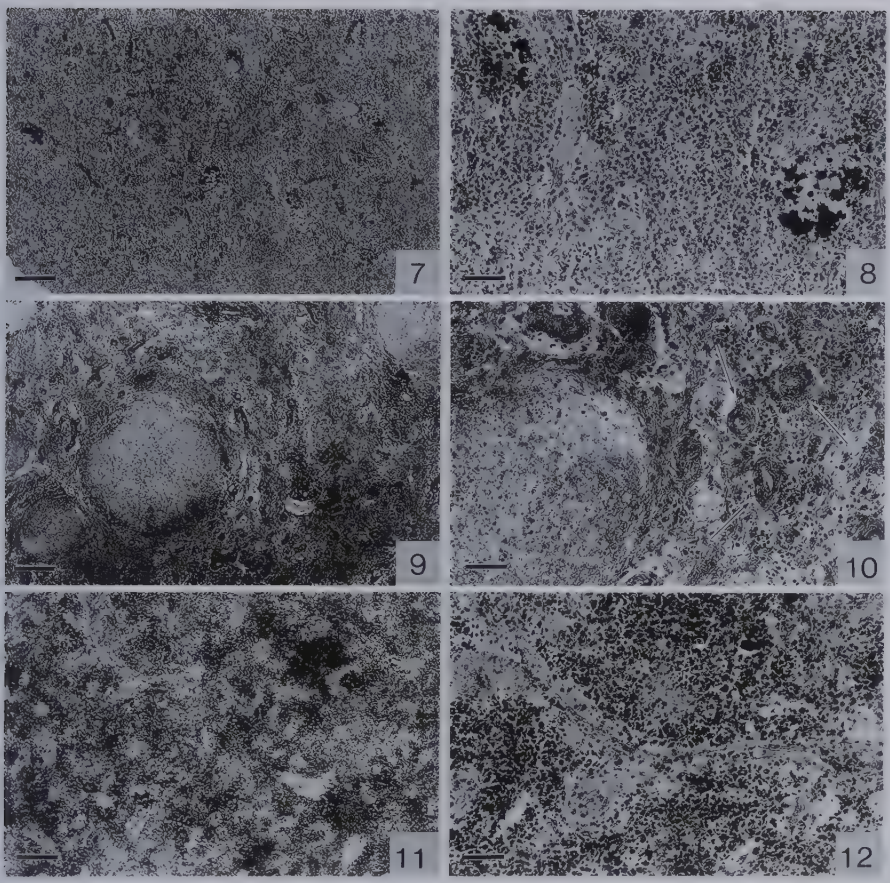


Fig.7. Section of spleen; control fish (bar=100μm).
Fig.8. High magnification of the spleen in Fig. 7. (bar=25μm).
Fig.9. Section of spleen ; diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station (bar=100μm).
Fig.10. High magnification of spleen in Fig. 9, showing the hemorrhage and necrosis of ellipsoid and pulp and degeneration of blood vessel (arrows) (bar=25μm).
Fig.11. Section of spleen; diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100μm).
Fig.12. High magnification of spleen in Fig.11, showing the necrosis of ellipsoid and pulp (bar=25μm).

Plate 3. Muscle of diseased hirame

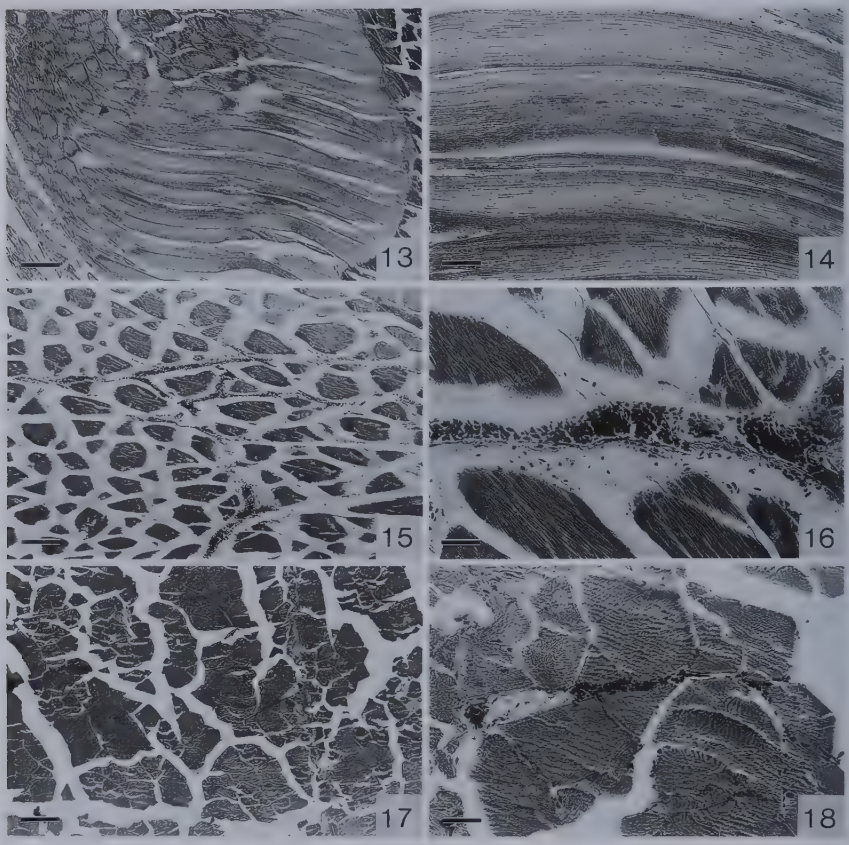


Fig.13. Section of muscle; control fish (bar=100μm).
Fig.14. High magnification of muscle in Fig.13. (bar=25μm).
Fig.15. Section of muscle ; diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station (bar=100μm).
Fig.16. High magnification of muscle in Fig.15, showing the hyperemia and hemorrhage of capillary vessels (bar=25μm).
Fig.17. Section of muscle; diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100 μm).
Fig.18. High magnification of muscle in Fig.17, showing the hyperemia and hemorrhage in the capillary vessels (bar=25μm).

Plate 4. Testis of diseased hirame

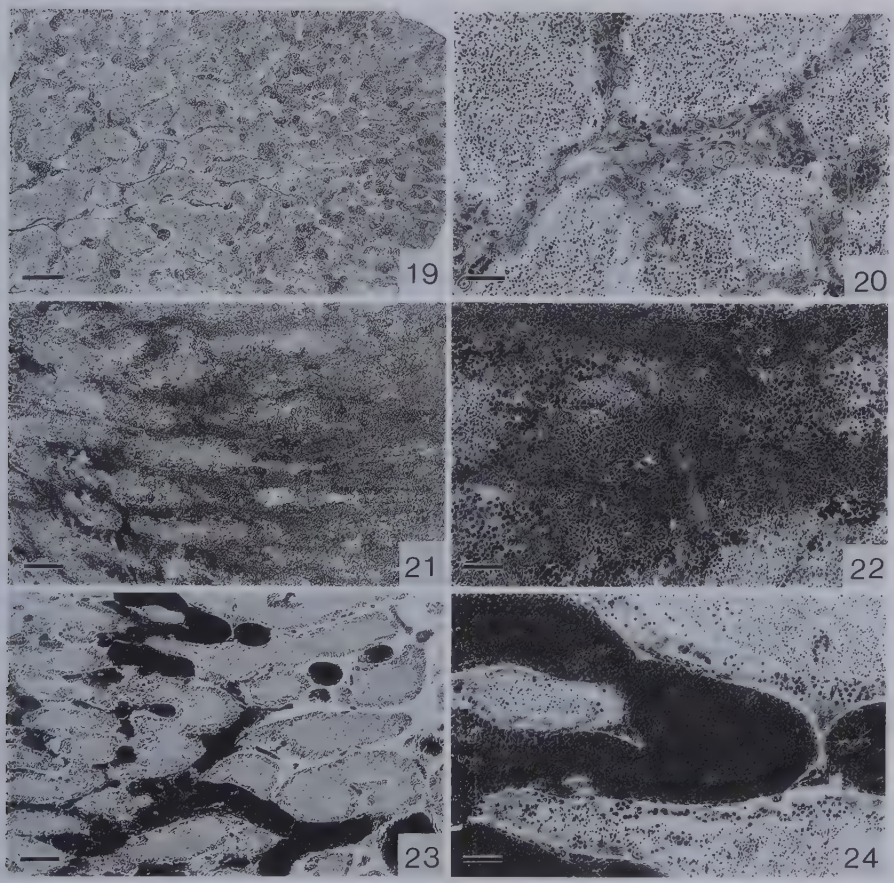


Fig.19. Section of testis; control fish (bar=100μm).
Fig.20. High magnification of testis in Fig.19. (bar=25μm).
Fig.21. Section of testis; diseased fish, sampled at Awaji Island, Hyogo Prefecture (bar=100μm).
Fig.22. High magnification of testis in Fig.21, showing the hyperemia and hemorrhage in tissue (bar=25μm).
Fig.23. Section of testis; diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100μm).
Fig.24. High magnification of testis in Fig.23, showing the hyperemia in the tissue (bar=25μm).

Plate 5. Ovary of diseased hirame

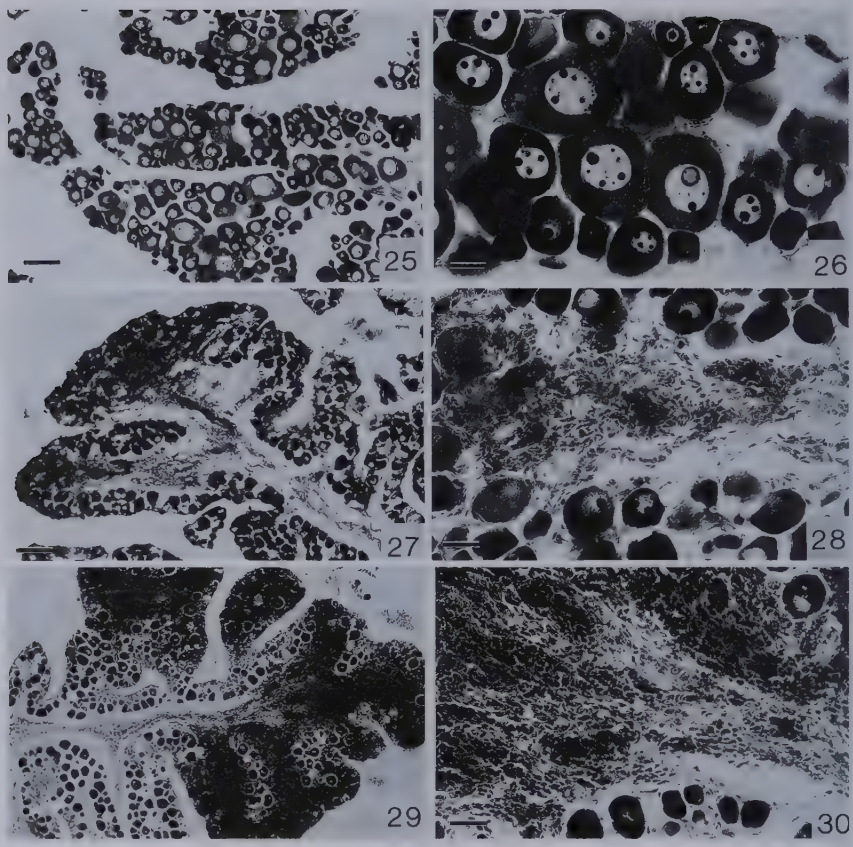


Fig.25. Section of ovary; control fish (bar=100μm).
Fig.26. High magnification of a portion of ovarian lamella in Fig.25. (bar=25μm).
Fig.27. Section of ovary; diseased fish, sampled at Awaji Island, Hyogo Prefecture (bar=100μm)
Fig.28. High magnification of ovarian lamella in Fig.27, showing the hyperemia and hemorrhage in interstitial connective tissue of ovarian lamella (bar=25μm).
Fig.29. Section of ovary; diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100μm).
Fig.30. High magnification of ovarian lamella in Fig.29, showing the hyperemia and hemorrhage in interstitial connective tissue of ovarian lamella (bar=25μm).

Plate 6. Liver of diseased hirame

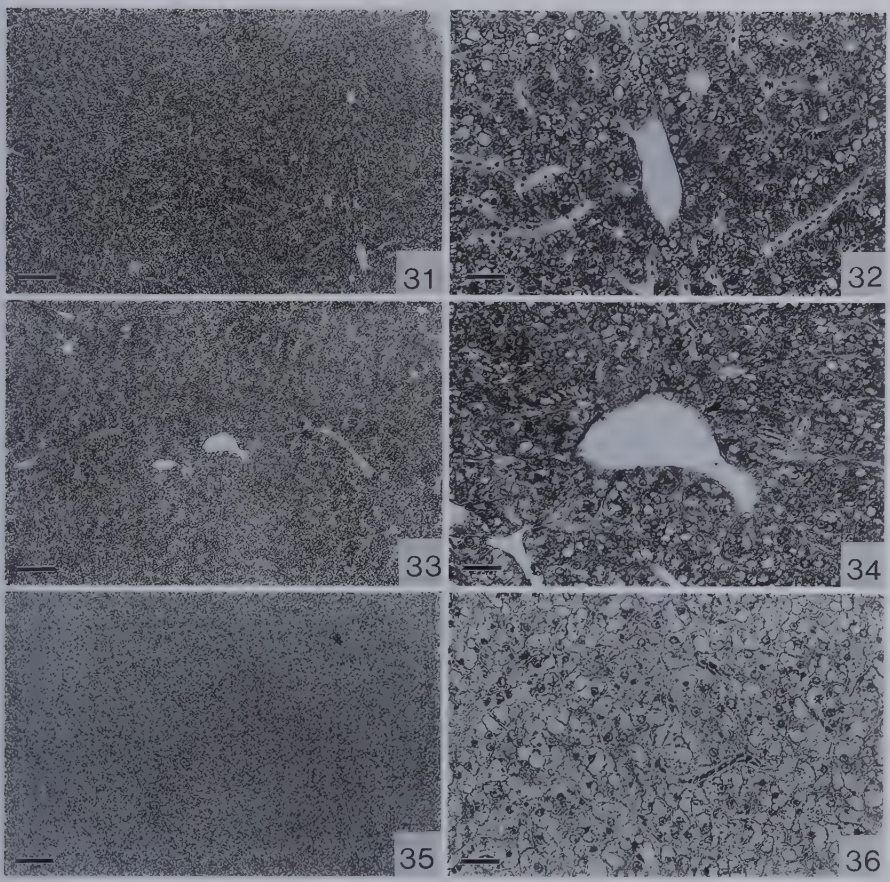


Fig.31. Section of liver; control fish (bar=100μm).
Fig.32. High magnification of liver in Fig.31. (bar=25μm).
Fig.33. Section of liver ; diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station (bar=100μm).
Fig.34. High magnification of liver in Fig.33. No histopathological changes were found in the tissue (bar=25μm).
Fig.35. Section of liver; diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100μm).
Fig.36. High magnification of liver in Fig.35. No histopathological changes were found in the tissue (bar=25μm).

Plate 7. Pancreas of diseased hirame

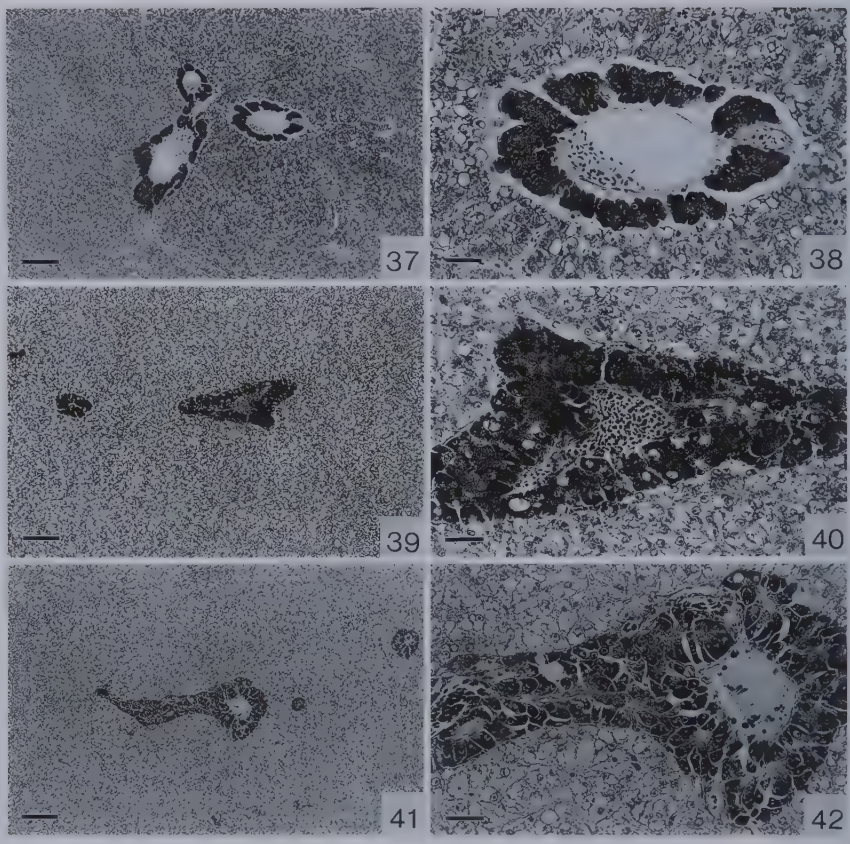


Fig. 37. Section of pancreas; control fish (bar=100μm).
Fig. 38. High magnification of pancreas in Fig.37. (bar=25μm).
Fig. 39. Section of pancreas ; diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station (bar=100μm).
Fig. 40. High magnification of pancreas in Fig.39. No histopathological changes were found in the tissue (bar=25μm).
Fig. 41. Section of pancreas; diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100 μm).
Fig. 42. High magnification of pancreas in Fig.41. No histopathological changes were found in the tissue (bar=25μm).

Plate 8. Alimentary tract of diseased hirame

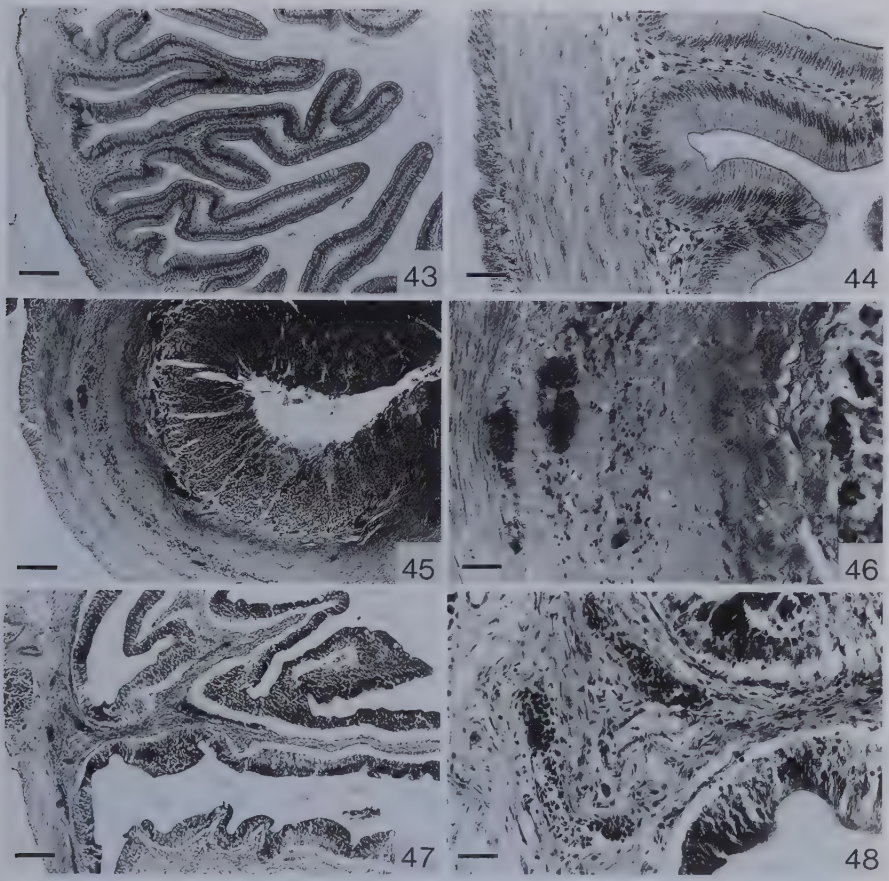


Fig.43. Section of intestine; control fish (bar=100μm).
Fig.44. High magnification of intestine in Fig.43. (bar=25μm).
Fig.45. Section of stomach ; diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station (bar=100μm).
Fig.46. High magnification of stomach in Fig.45, showing the hyperemia and hemorrhage in mucosa (bar=25μm).
Fig.47. Section of stomach; diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100 μm).
Fig.48. High magnification of stomach in Fig.47, showing the hyperemia in mucosa (bar= 25μm).

Plate 9. Diseased rainbow trout and masu salmon (body weight 0.5g) infected with HRV by intraperitoneal injection.

Fig.49. Diseased rainbow trout, showing hemorrhage of skeletal muscle, accumulation of ascitic fluid and bilateral exopthalmus.

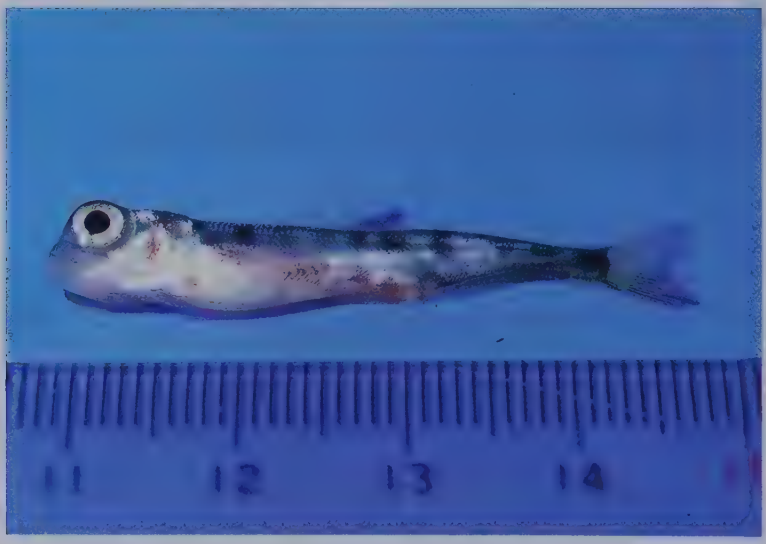


Fig.50. Diseased masu salmon showing the similer signs as infected rainbow trout

Plate 10. Diseased rainbow trout (body weight 3.0g) infected with HRV by intraperitoneal injection.

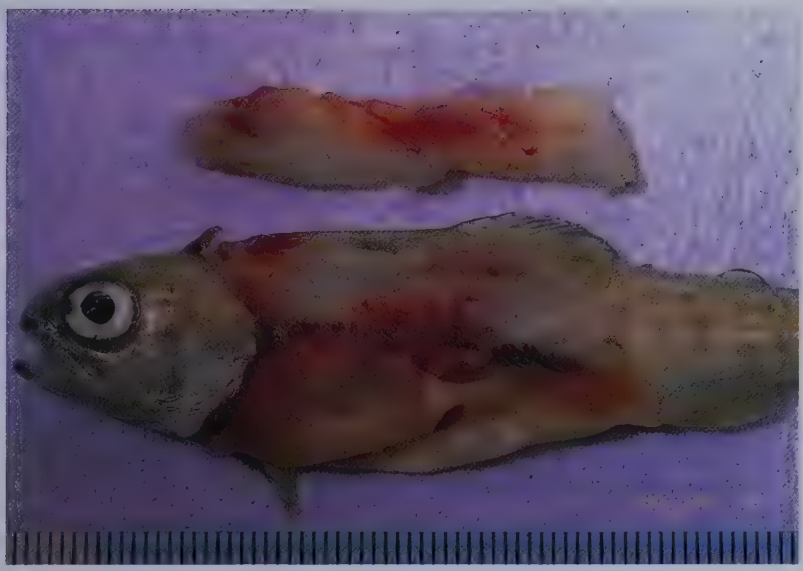


Fig.51. Hemorrhage of skeletal muscle, spleen and kidney; accumulation of ascitic fluid and bilateral exopthalmus were observed.

Plate 11. Kidney (body kidney) of diseased rainbow trout

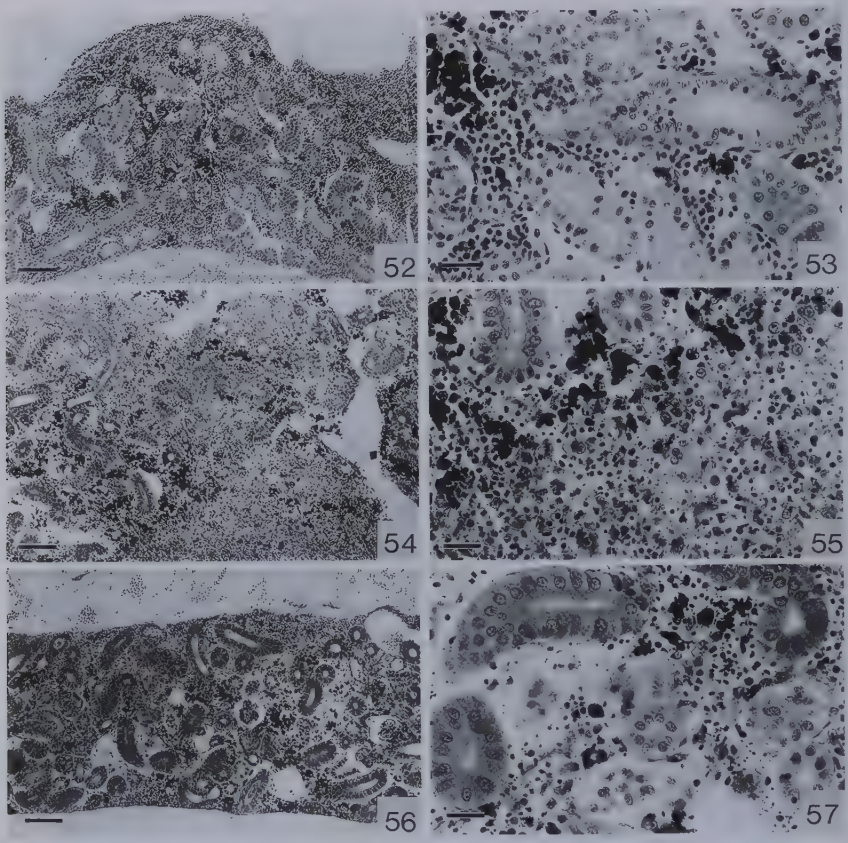


Fig.52. Section of kidney; control fish (bar=100μm).
Fig.53. High magnification of kidney in Fig.52. (bar=25μm).
Fig.54. Section of kidney; diseased fish infected with HRV (bar=100μm).
Fig.55. High magnification of kidney in Fig.54, showing the necrosis of hematopoietic cells and hemorrhage in the interstitial lymphoid tissue (bar=25μm).
Fig.56. Section of kidney; diseased fish infected with IHNV (bar=100μm).
Fig.57. High magnification of kidney in Fig.56, showing the necrosis of hematopoietic cells in the interstitial lymphoid tissue and of epithelial cells of urinary tubule (bar=25 μm).

Plate 12. Head kidney of diseased rainbow trout

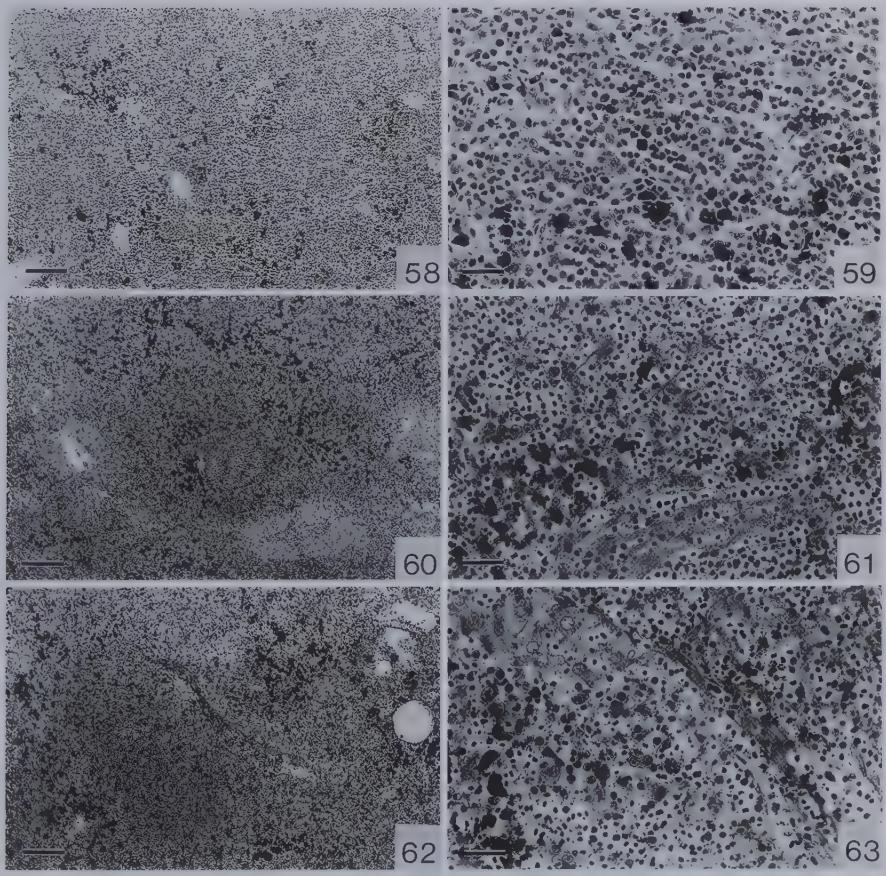


Fig.58. Section of head kidney; control fish (bar=100μm).
Fig.59. High magnification of head kidney in Fig.58.(bar=25μm).
Fig.60. Section of head kidney; diseased fish infected with HRV (bar=100μm).
Fig.61. High magnification of head kidney in Fig.60, showing the necrosis of hematopoietic cells and hemorrhage in the interstitial lymphoid tissue (bar=25μm).
Fig.62. Section of head kidney; diseased fish infected with IHNV (bar=100μm).
Fig.63. High magnification of head kidney in Fig.62. Showing the necrosis of hematopoietic cells in the interstitial lymphoid tissue (bar=25μm).

Plate 13. Spleen of diseased rainbow trout

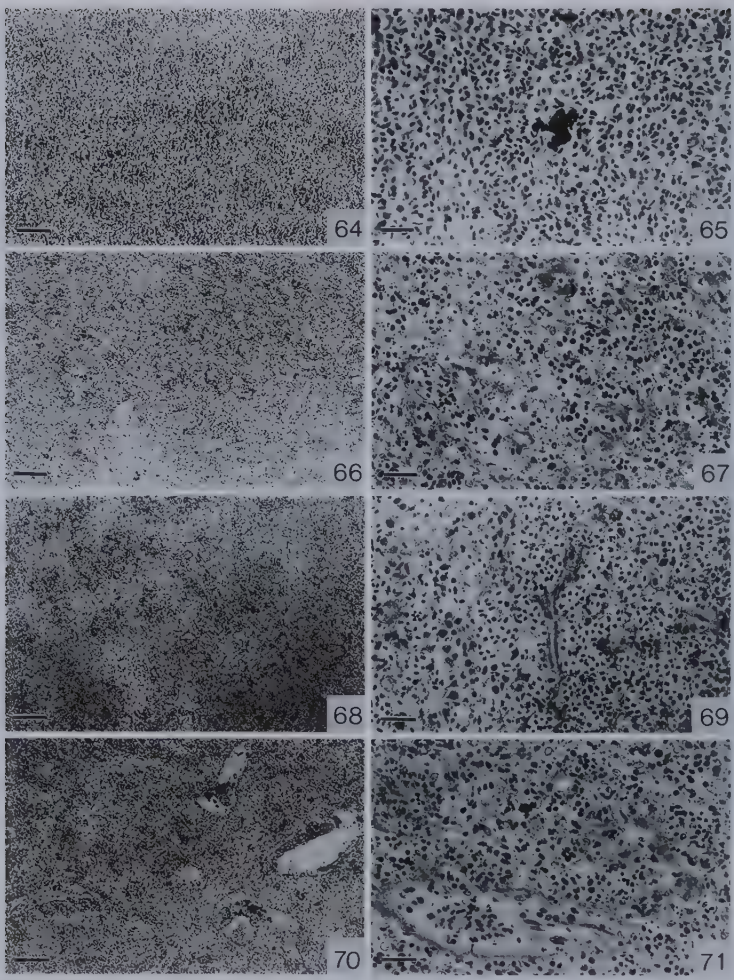


Fig.64. Section of spleen; control fish (bar=100μm).
Fig.65. High magnification of spleen in Fig.64. (bar=25μm).
Fig.66. Section of spleen; diseased fish, 6 days after HRV infection (bar=100μm).
Fig.67. High magnification of the spleen in Fig.66. Showing the necrosis of ellipsoid and pulp (bar=25μm).
Fig.68. Section of spleen; diseased fish, 15 days after HRV infection (bar=100μm).
Fig.69. High magnification of spleen in Fig.68, showing the hemorrhage and necrosis of ellipsoid and pulp (bar=25μm).
Fig.70. Section of spleen; diseased fish infected with IHNV (bar=100μm).
Fig.71. High magnification of the spleen in Fig.70, showing necrosis of ellipsoid and pulp (bar=25μm).

Plate 14. Liver of diseased rainbow trout

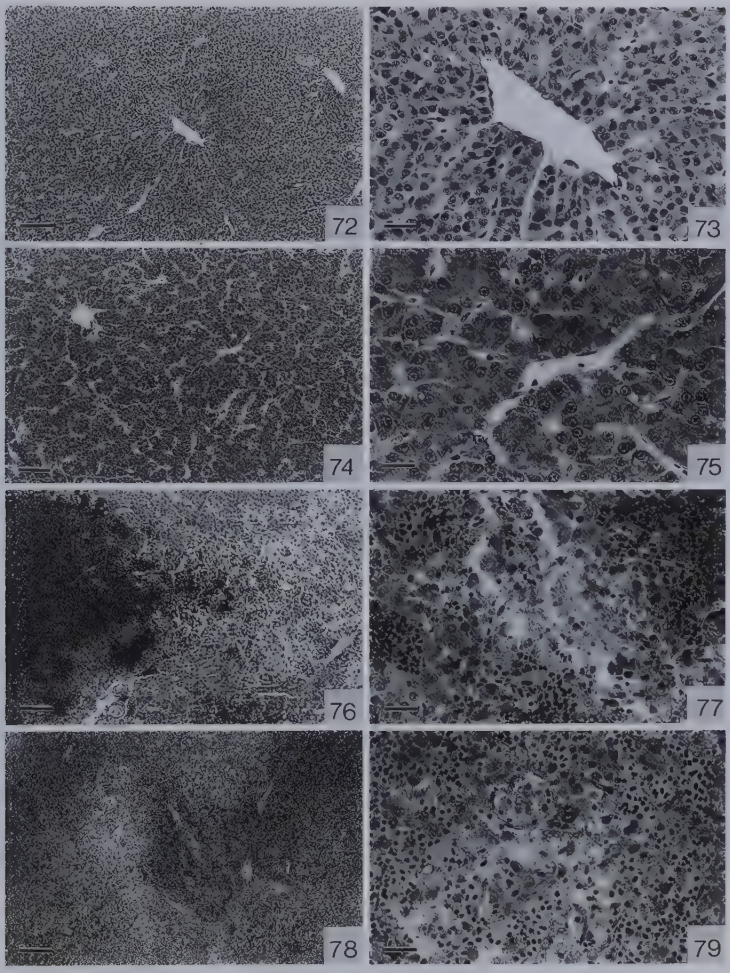


Fig.72. Section of liver; control fish (bar=100μm).
Fig.73. High magnification of liver in Fig.72.(bar=25μm).
Fig.74. Section of liver; diseased fish, 5 days after HRV infection (bar=100μm).
Fig.75. High magnification of liver in Fig.74. No histopathological changes were found in the tissue (bar=25μm).
Fig.76. Section of liver; diseased fish, 15 days after HRV infection (bar=100μm).
Fig.77. High magnification of the liver in Fig.76, showing the necrois of hepatic cells and hemorrhage in the tissue (bar=25μm).
Fig.78. Section of liver; diseased fish infected with IHNV (bar=100μm).
Fig.79. High magnification of liver in Fig.78, showing the necrosis of hepatic cells and hemorrhage in the tissue (bar=25μm).

Plate 15. Muscle of diseased rainbow trout

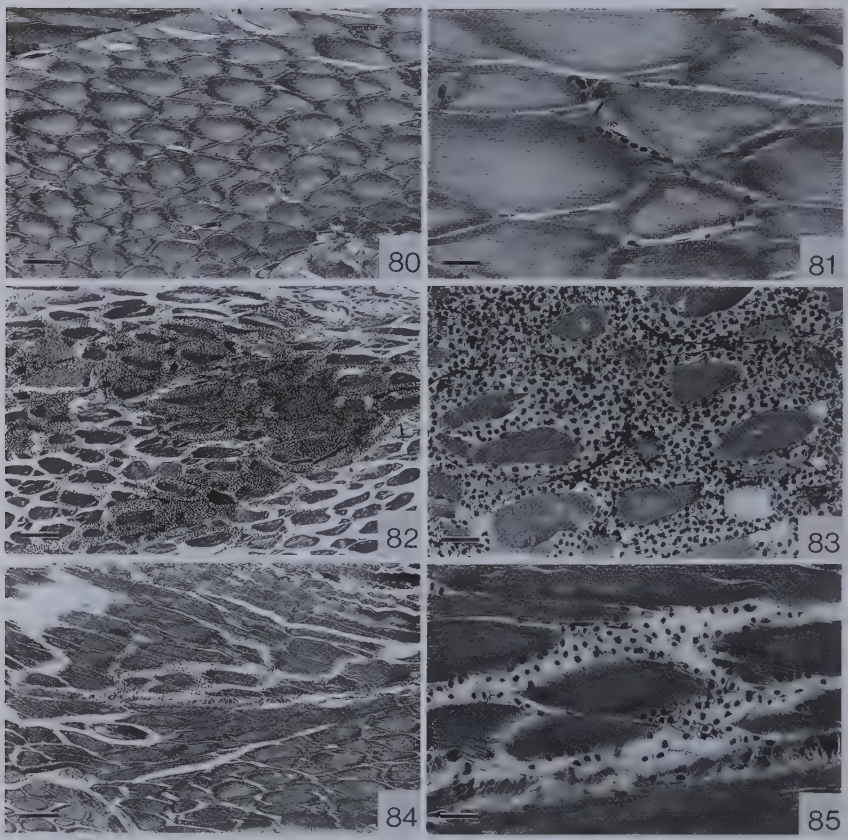


Fig.80. Section of muscle; control fish (bar=100μm).
Fig.81. High magnification of muscle in Fig.80. (bar=25μm).
Fig.82. Section of muscle; diseased fish infected with HRV (bar=100μm).
Fig.83. High magnification of muscle in Fig.82, showing the hyperemia and heavy hemorrhage of capillary vessels (bar=25μm).
Fig.84. Section of muscle; diseased fish infected with IHNV (bar=100μm).
Fig.85. High magnification of muscle in Fig.84. No heavy hemorrhage in the capillary vessels was observed (bar=25μm).

Plate 16. Pancreas of diseased rainbow trout

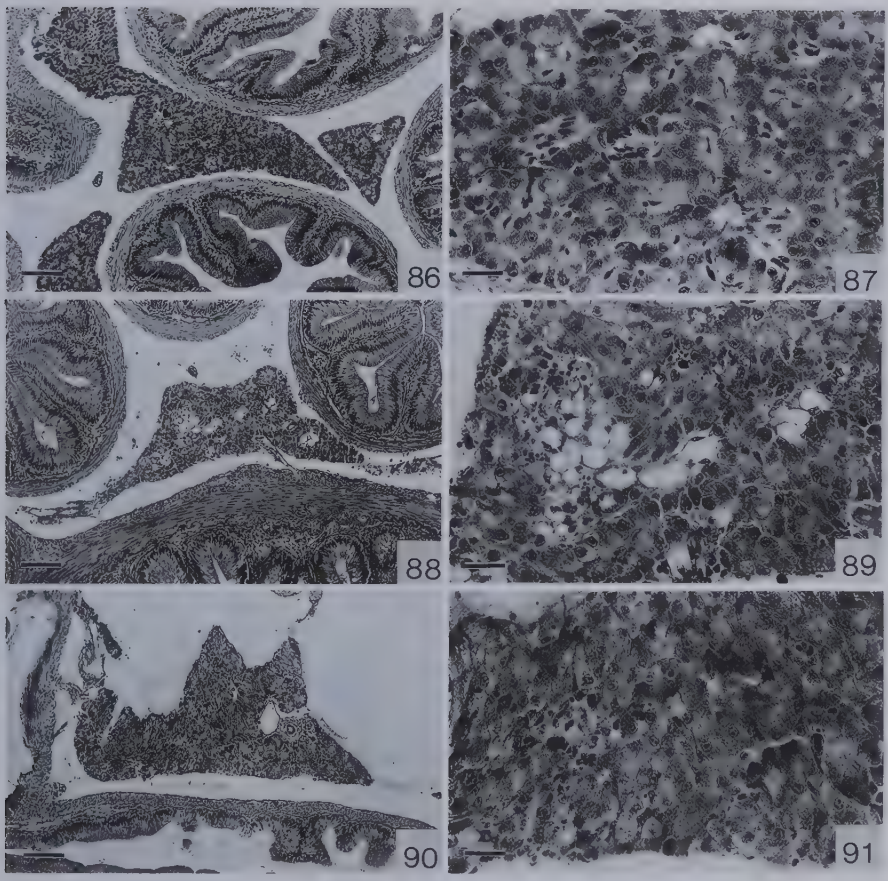


Fig.86. Section of pancreas; control fish (bar=100μm).
Fig.87. High magnification of pancreas in Fig.86. (bar=25μm).
Fig.88. Section of pancreas; diseased fish infected with HRV (bar=100μm).
Fig.89. High magnification of pancreas in Fig.88, showing the focal necrosis of acinar cells (bar=25μm).
Fig.90. Section of pancreas; diseased fish infected with IHNV (bar=100μm).
Fig.91. High magnification of pancreas in Fig.90, showing the focal necrosis of acinar cells (bar=25μm).

Plate 17. Intestine of diseased rainbow trout

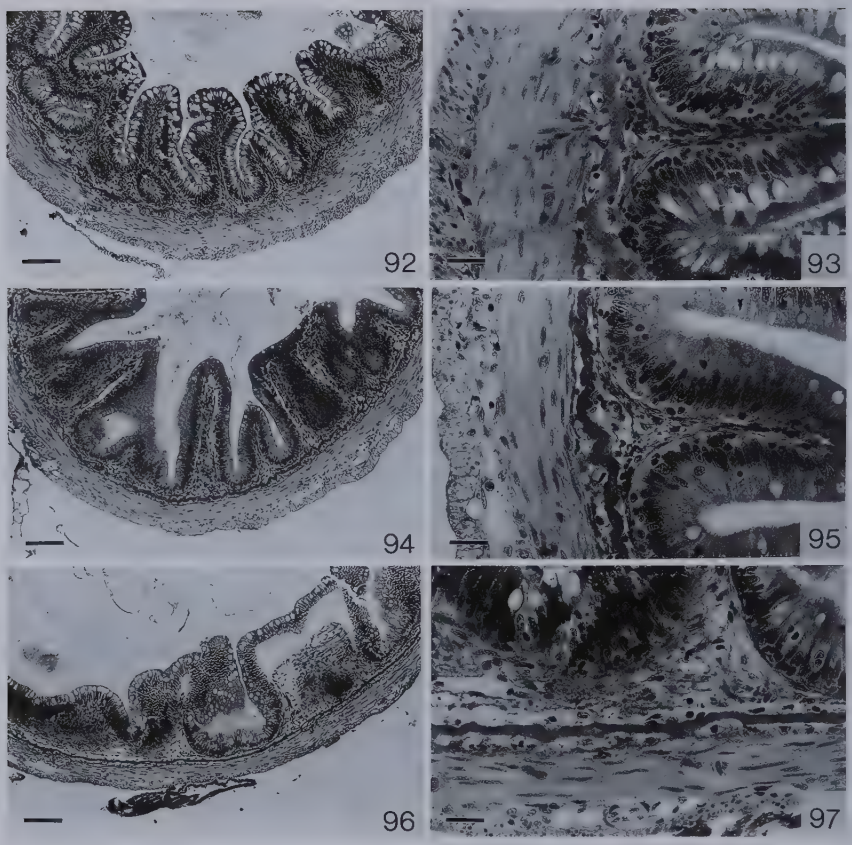


Fig. 92. Section of intestine; control fish (bar=100μm)
Fig. 93. High magnification of intestine in Fig.92. (bar=25μm).
Fig. 94. Section of intestine; diseased fish infected with HRV (bar=100μm).
Fig. 95. High magnification of intestine in Fig.94. No histo pathological changes were found in the tissue (bar=25μm).
Fig. 96. Section of intestine; diseased fish infected with IHNV. (bar=100μm).
Fig. 97. High magnification of intestine in Fig.96, showing the necrosis of eosinophilic granular cells (EGC) in stratum compactum and of submucosa (bar=25μm).

Plate 18. Microsopical observation of RTG-2 cells infected with HRV, IHNV, PFRV, EVA and EVEX.

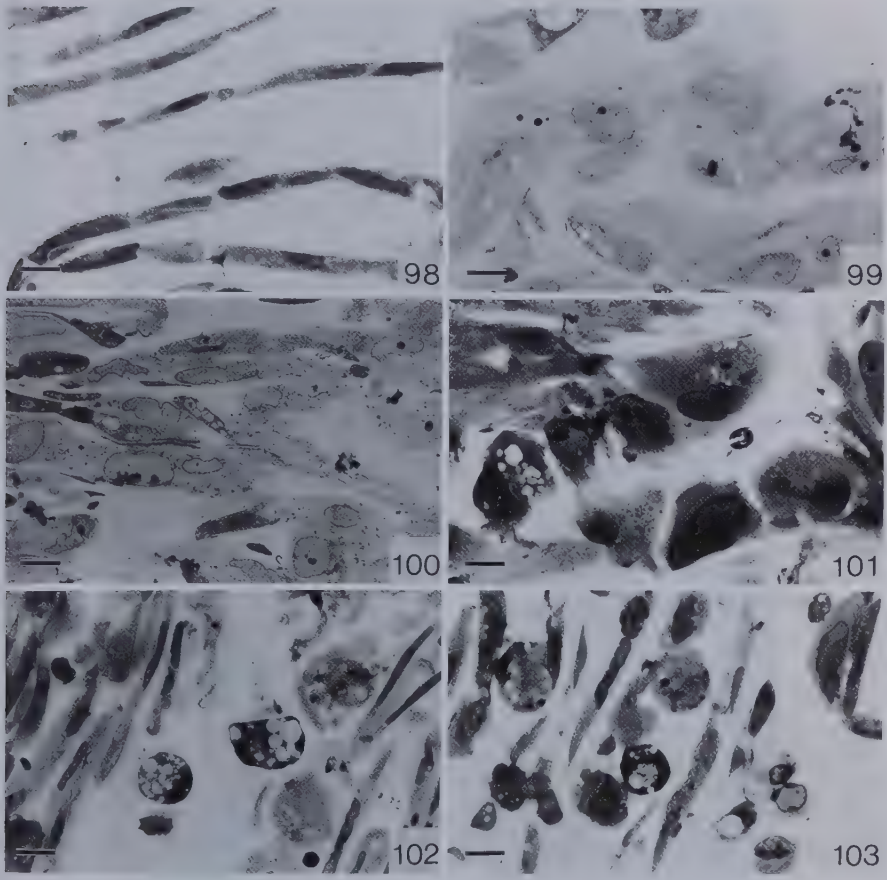


Fig.98. Section of control cells (Toluidine Blue, bar=8μm).
Fig.99. Section of HRV infected cells, at 22 hr post-infection, showing the rounded cells and hypertrophy of nuclei in their cells (Toluidine Blue, bar=8μm).
Fig.100. Section of IHNV infected cells, at 20 hr post-infection, showing the rounded cells and hypertrophy of nuclei in their cells (Toluidine Blue, bar=8μm).
Fig.101. Section of PFRV infected cells, at 20 hr post infection, showing the hypertrophy of nuclei and cells (Toluidine Blue, bar=8μm).
Fig.102. Section of EVA infected cells, at 16 hr post-infection, showing the rounded cells and nuclear degeneration. (Toluidine Blue, bar=8μm).
Fig.103. Section of EVEX infected cells, at 16 hr post-infection, showing the rounded cells and nuclear degeneration. (Toluidine Blue, bar=8μm).

Plate 19. Ultrastructural observation on HRV in RTG-2 cells.

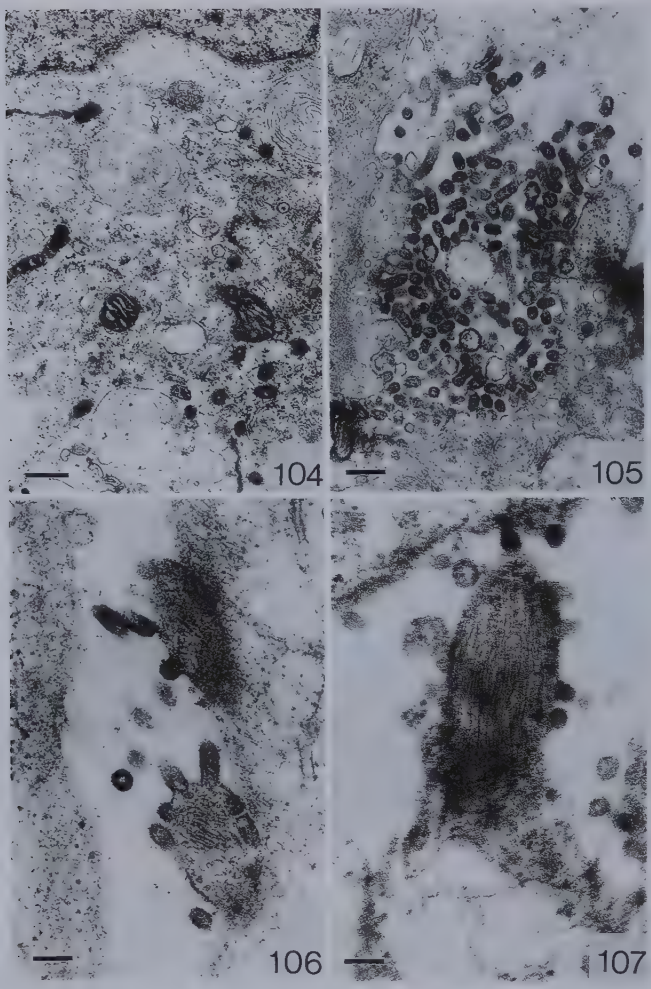


Fig.104. Electron micrograph of HRV infected cells, at 10 hr post-infection, showing lower electron density of cytoplasm and degeneration of mitochondria (bar=500nm).

Fig.105. Viral particles budding from the cell membrane and many other particles at the outside of cell, 12 hr post-infection (bar=300nm).

Fig.106. Club-like protuberance on the surface of cell, including the microfilament-like structure, 12 hr post-infection (bar=150nm).

Fig.107. Club-like protuberance on the surface of cell and viral particles budding from this protuberance, 12 hr post-infection (bar=150nm).

Plate 20. Ultrastructural observation on HRV in RTG-2 cells.

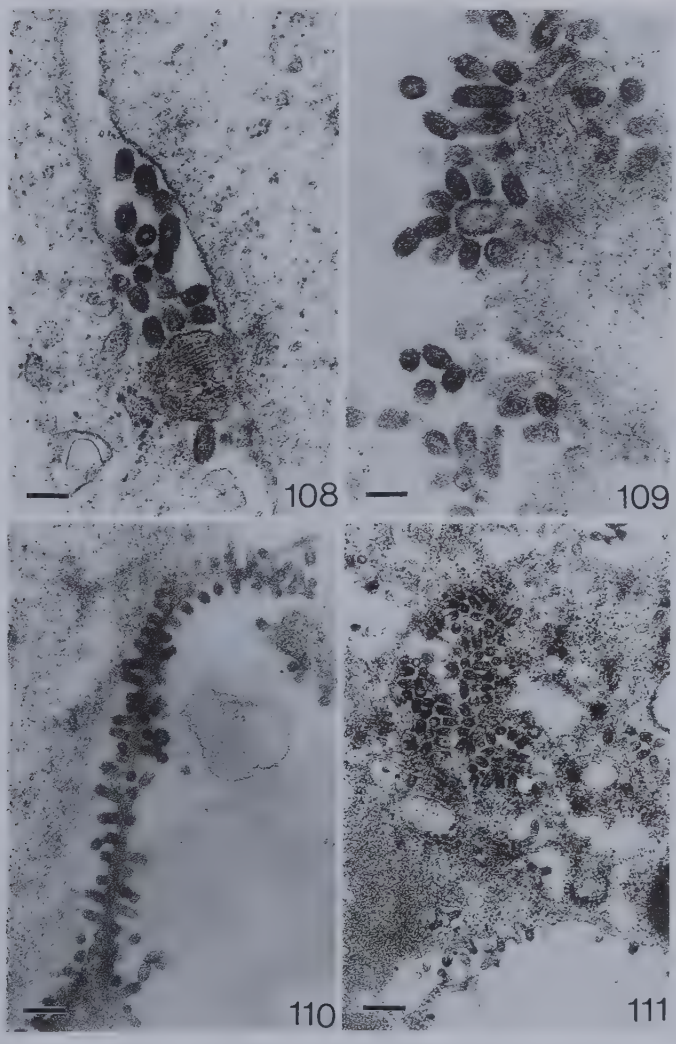


Fig.108. Electron micrograph of club-like protuberance on the surface of cell and viral particles budding from this protuberance, 20 hr post-infection (bar=150nm).

Fig.109. Club-like protuberance on the surface of cell and viral particles budding from this protuberance, 20 hr post-infection (bar=150nm).

Fig.110. Long cord-like protuberance on the surface of cell and viral particles budding from this protuberance, 20 hr post-infection, (bar=300nm).

Fig.111. Degenerated cell and viral particles within a cellular vacuole, 24 hr post-infection. Showing higher electron density of cytoplasm (bar=300nm).

Plate 21. Ultrastructural observation on IHNV in RTG-2 cells.

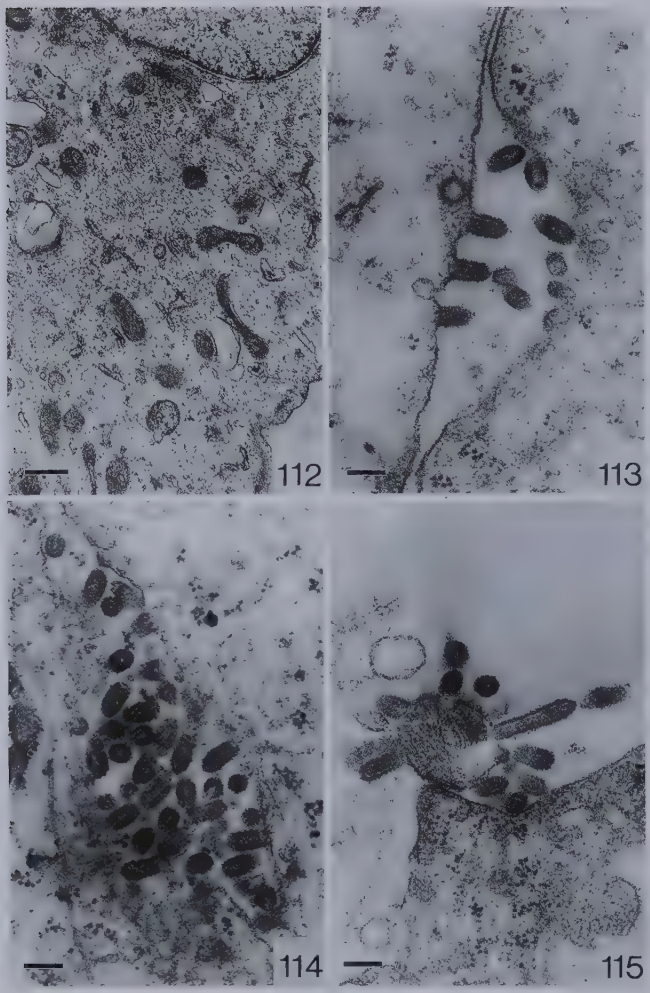


Fig.112. Electron micrograph of IHNV infected cells, 10 hr post-infection. Showing lower electron density of cytoplasm and degenerationof mitochondria (bar=500nm).

Fig.113. Viral particles budding from cell membrane and many other particles outside the cell, 12hr post-infection (bar=150nm).

Fig.114. Many viral particles at the outside of cell, 12 hr post-infection (bar=150nm).

Fig.115. Club-like protuberance on the surface of cell and viral particles budding from this protuberance, 12 hr post-infection (bar=150nm).

Plate 22. Ultrastructural observation on PFRV in RTG-2 cells.

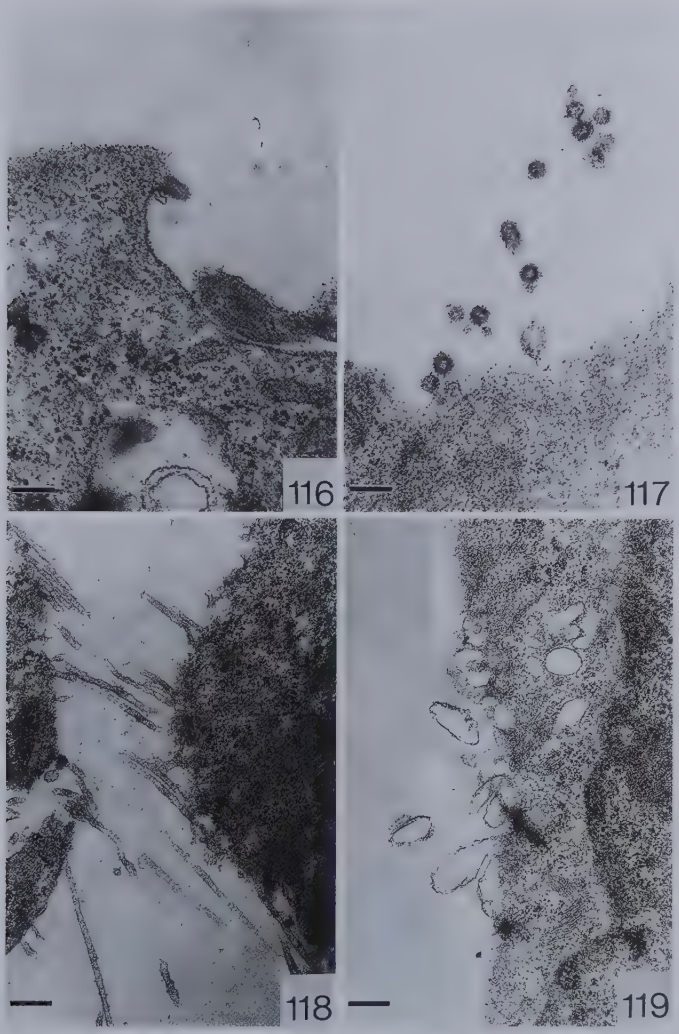


Fig.116. Electron micrograph of viral particles budding from the cell membrane, 12 hr post-infection (bar=150nm).
Fig.117. Viral particles at the outside of cell, 12 hr post-infection (bar=150nm).
Fig.118. Rod-like structure on the surface of cell, 12 hr post-infection (bar=300nm).
Fig.119. Bubble-like structure on the surface of cell, 12 hr post-infection (bar=300nm).

Plate 23. Ultrastructural observation on EVA in RTG-2 cells.

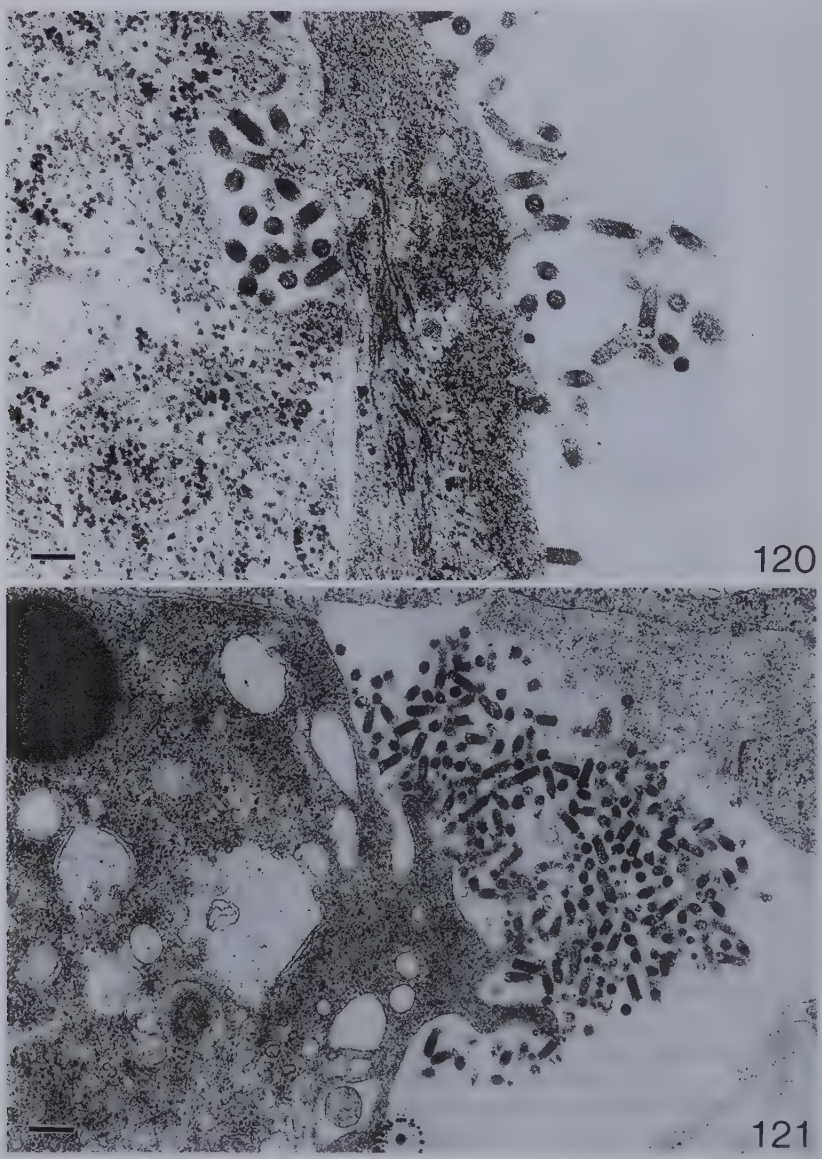


Fig.120. Electron micrograph of viral particles budding from the cell membrane, 12 hr post-infection (bar=150nm).

Fig.121. Many viral particles are observed at the outside of cell, 12 hr post-infection (bar=300nm).

Plate 24. Ultrastructural observation on EVEX in RTG-2 cells.

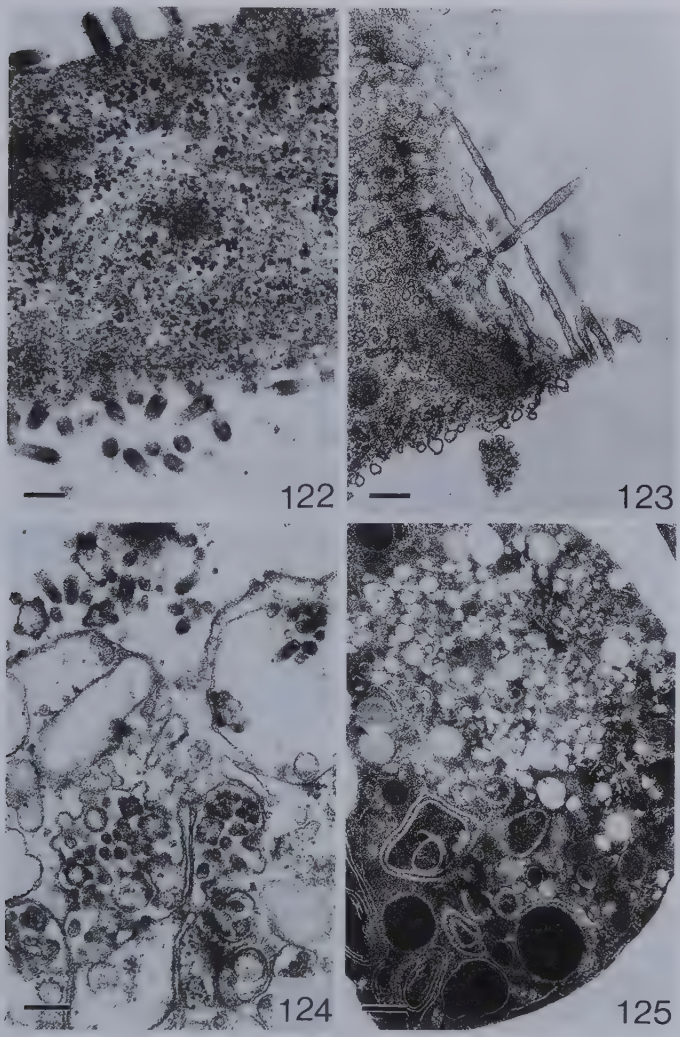


Fig.122. Electron micrograph of viral particles budding from the cell membrane, 12 hr post-infection (bar=150nm).

Fig.123. Rod-like structure on the surface of cell, 12 hr post-infection (bar=300nm).

Fig.124. Degenerated cell, 16 hr post-infection, showing many vacuoles and higher electron density of cytoplasm (bar=250nm).

Fig.125. Degenerated cell, 24 hr post-infection, showing many viral particles within a cellular vacuole and on the bended cell membrane (bar=1μm).

Plate 25. Ultrastructural observation on the kidney of hirame naturally infected with HRV.

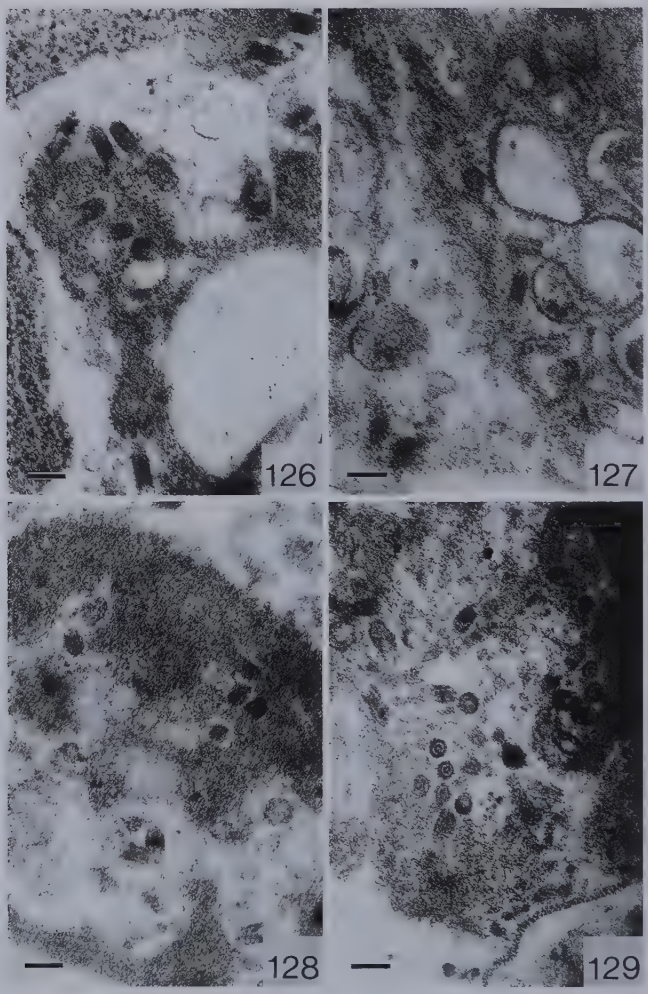


Fig.126.～129. Electron micrograph of retothelial cell in the kidney, showing viral particles budding from the cell membrane and many other particles at the outside of cell (bar＝150nm).

Plate 26. Ultrastructural observation on the kidney of rainbow trout artificially infected with HRV.

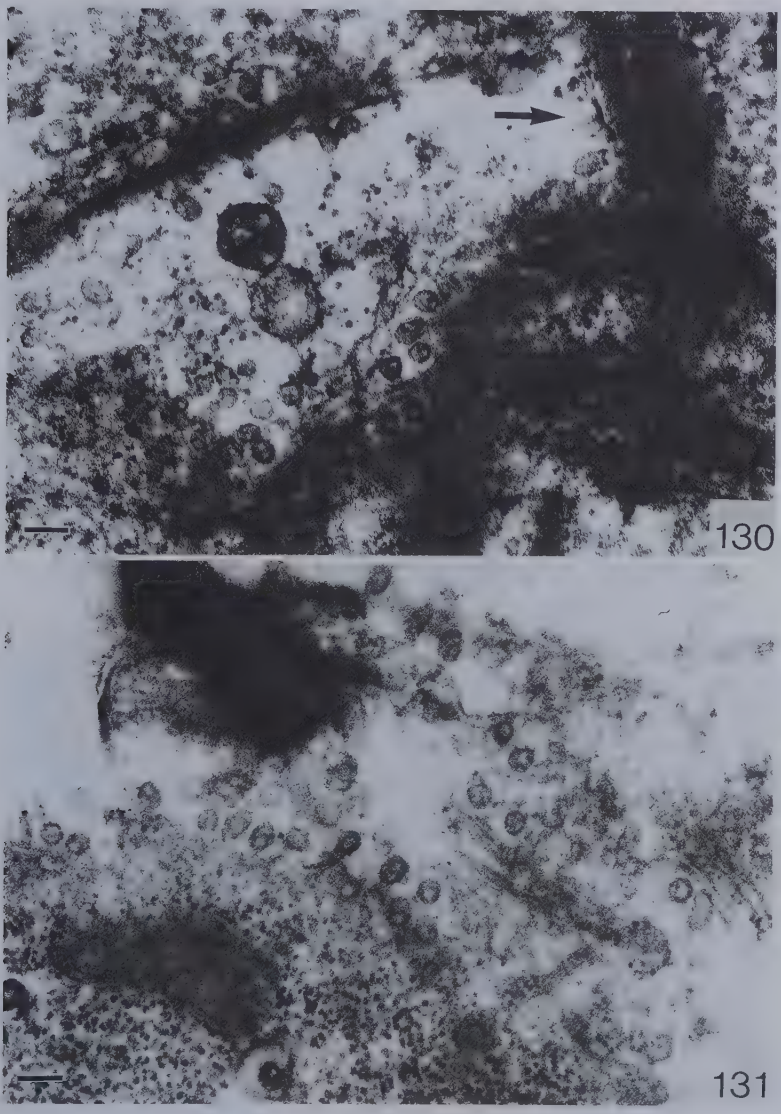


Fig.130, 131. Electron micrograph of retothelial cell in the kidney, showing viral particles budding from the cell membrane and many other particles at the outside of cell. Club-like protuberance on the surface of cell (arrow) and viral particles budding from this protuberance were observed (bar=150nm).

Plate 27. Ultrastructural observation on the kidney of rainbow trout artificially infected with HRV.

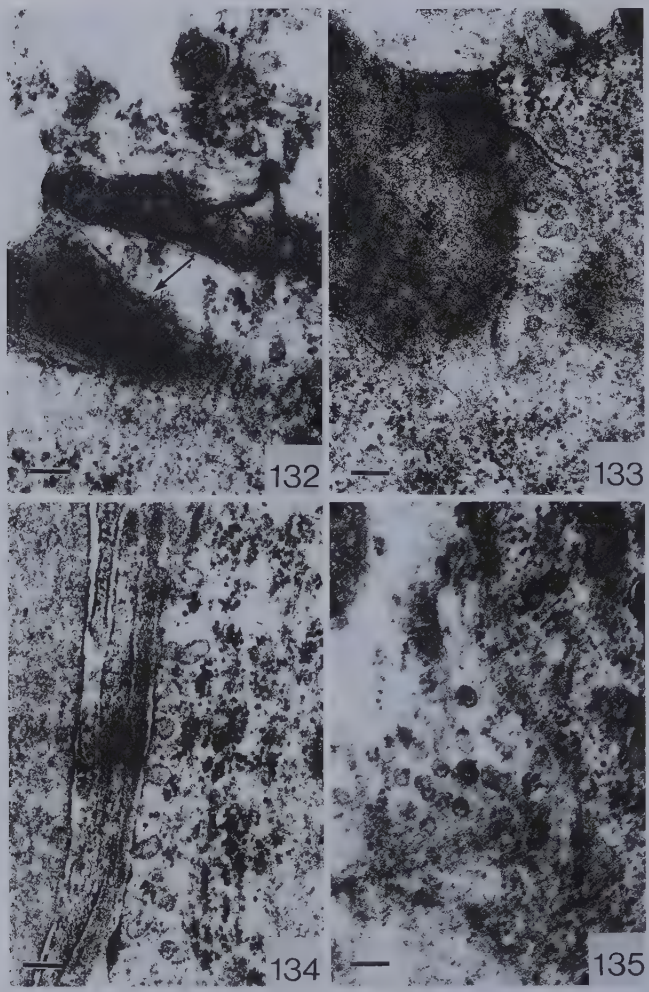


Fig.132.～135. Electron micrograph of retothelial cell in the kidney, showing viral particles budding from the cell membrane and many other particles at the outside of cell. Club-like protuberance on the surface of cell (arrow) and viral particles budding from this protuberance were observed (bar=150nm).

Plate 28. Signs of dseased hirame of test group, reared at 10℃.

Fig.136. Focal hemorrhage in skeletal muscle and fins was observed.

Fig.137. Hemorrhage of skeletal muscle, accumulation of ascitic fluid and congestion of gonad were observed.

Plate 29. Kidney lesions of HRV-infected hirame reared at various water temperatures.

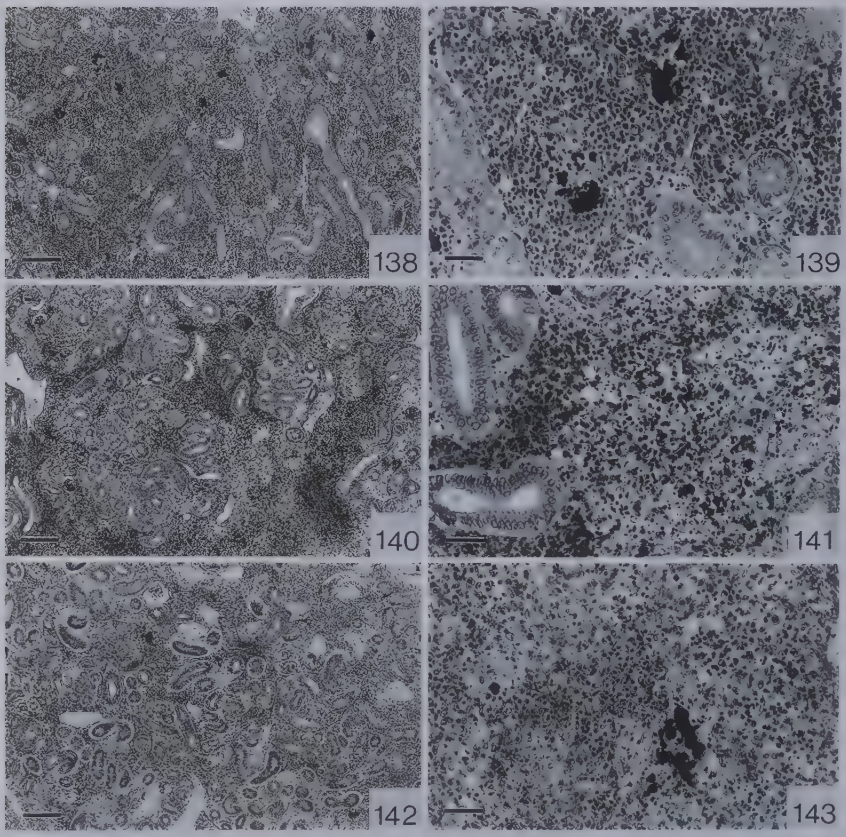


Fig.138. Section of kidney; control fish (bar=100μm).
Fig.139. High magnification of kidney in Fig.138. (bar=25μm).
Fig.140. Section of kidney ; moribund fish, reared at 5 ℃, showing the necrosis of hematopoietic cells and hemorrhage in the interstitial lymphoid tissue (bar=100μm).
Fig.141. High magnification of kidney in Fig.140, Swelling of nucreus is found in hematopoietic cells (bar=25μm).
Fig.142. Section of kidney; moribund fish, reared at 10℃ (bar=100μm).
Fig.143. High magnification of kidney in Fig.142, showing the necrosis of hematopoietic cells and hemorrhage in the interstitial lymphoid tissue (bar=25μm).

Plate 30. Kidney lesions of HRV-infected hirame reared at various water temperatures.

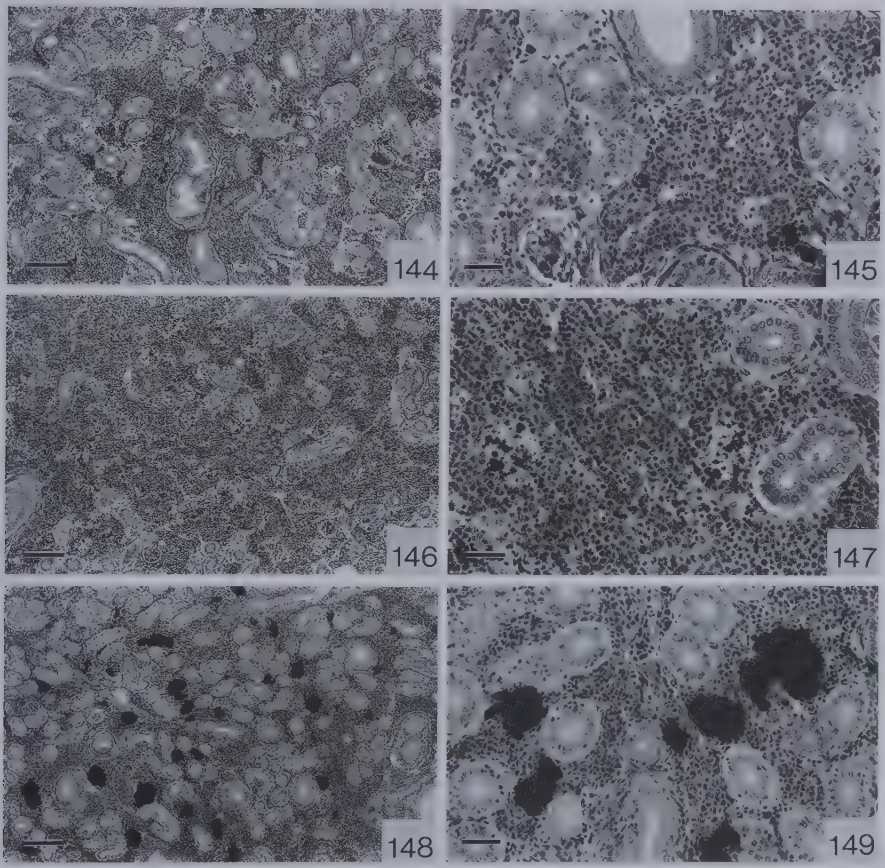


Fig.144. Section of kidney; asymptomatic fish infected with HRV, reared at 10℃ (bar=100 μm).

Fig.145. High magnification of kidney in Fig.144. No histopathological changes were found in the tissue (bar=25μm).

Fig.146. Section of kidney; asymptomatic fish infected with HRV, rear at 15℃ (bar=100μm).

Fig.147. High magnification of kidney in Fig.146. No histopathological changes were found in the tissue (bar=25μm).

Fig.148. Section of kidney; asymptomatic fish infected with HRV, reared at 20℃ (bar=100 μm).

Fig.149. High magnification of kidney in Fig.148. Hyperplasia of melanomacrophage was found in hematopoietic tissue (bar=25μm).

Plate 31. Spleen lesions of HRV-infected hirame reared at various water temperatures.

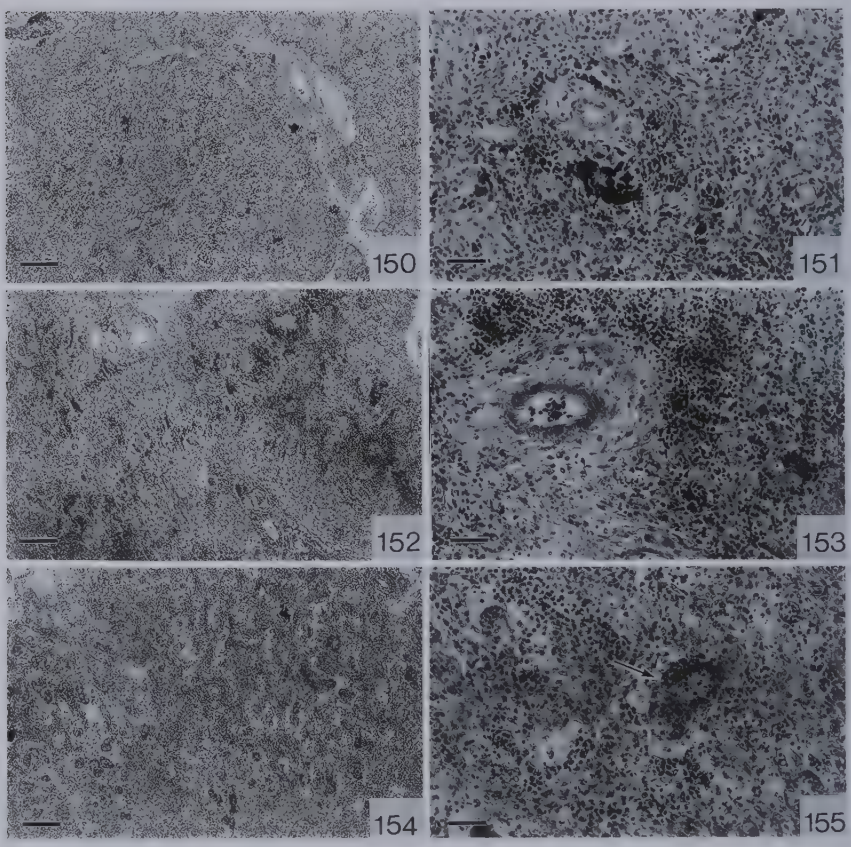


Fig.150. Section of spleen; control fish (bar=100μm).
Fig.151. High magnification of spleen in Fig.150. (bar=25μm).
Fig.152. Section of spleen; moribund fish, reared at 5℃, showing the necrosis of ellipsoid and hemorrhage in tissue (bar=100μm).
Fig.153. High magnification of spleen in Fig.152. Swelling of nucleus were found in the cells of pulp (bar=25μm).
Fig.154. Section of spleen; moribund fish, reared at 10℃, showing necrosis of pulp (bar=100 μm).
Fig.155. High magnification of spleen in Fig.154, showing the degeneration of sheathed artery, arrow (bar=25μm).

Plate 32. Spleen lesions of HRV-infected hirame reared at various water temperatures.

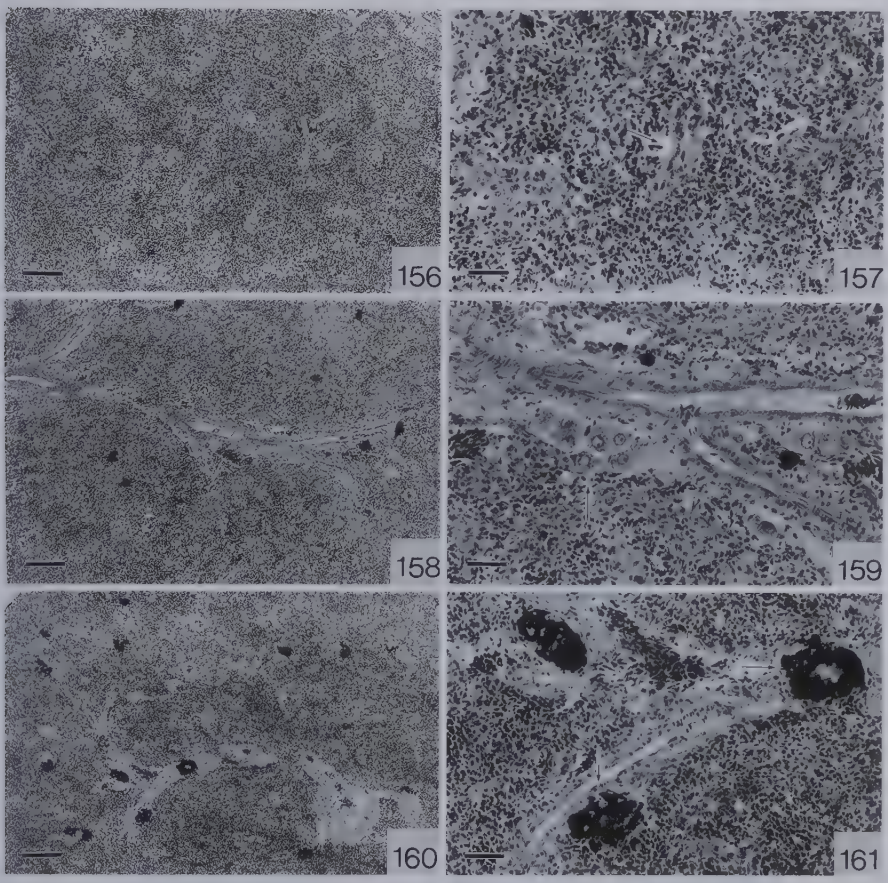


Fig.156. Section of spleen; asymptomatic fish infected with HRV, reared at 10℃ (bar=100 μm).

Fig.157. High magnification of spleen in Fig.156, showing the degeneration of blood vessel, arrow (bar=25μm).

Fig.158. Section of spleen; asymptomatic fish infected with HRV, reared at 15℃ (bar=100 μm).

Fig.159. High magnification of spleen in Fig.158, showing the infiltration of macrophage, arrow (bar=25μm).

Fig.160. Section of spleen ; asymptomatic fish infected with HRV, reared at 20 ℃. Hyperplasia of melanomacrophage are recognized in hematopoietic tissue (bar=100μm).

Fig.161. High magnification of spleen in Fig.160, showing the melanomacrophage in hematopoietic tissue, arrows (bar=25μm).

Plate 33. Ultrastructural observation on the kidney of hirame artificially infected with HRV.

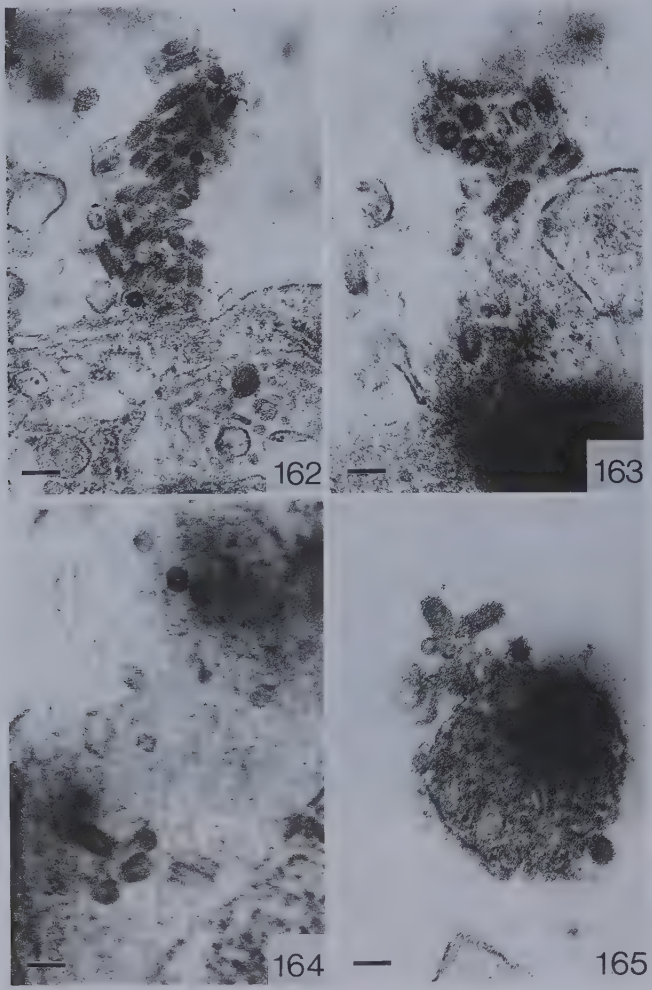


Fig. 162～165. Electron micrograph of retothelial cell in the kidney. Showing viral particles budding from the cell membrane and many other particles at the outside of cell. Club-like protuberance on the surface of cell (arrow) and viral particles budding from this protuberance were observed (bar＝150 nm).

Plate 34. Blood smears of HRV-infected hirame reared at various water temperatures.

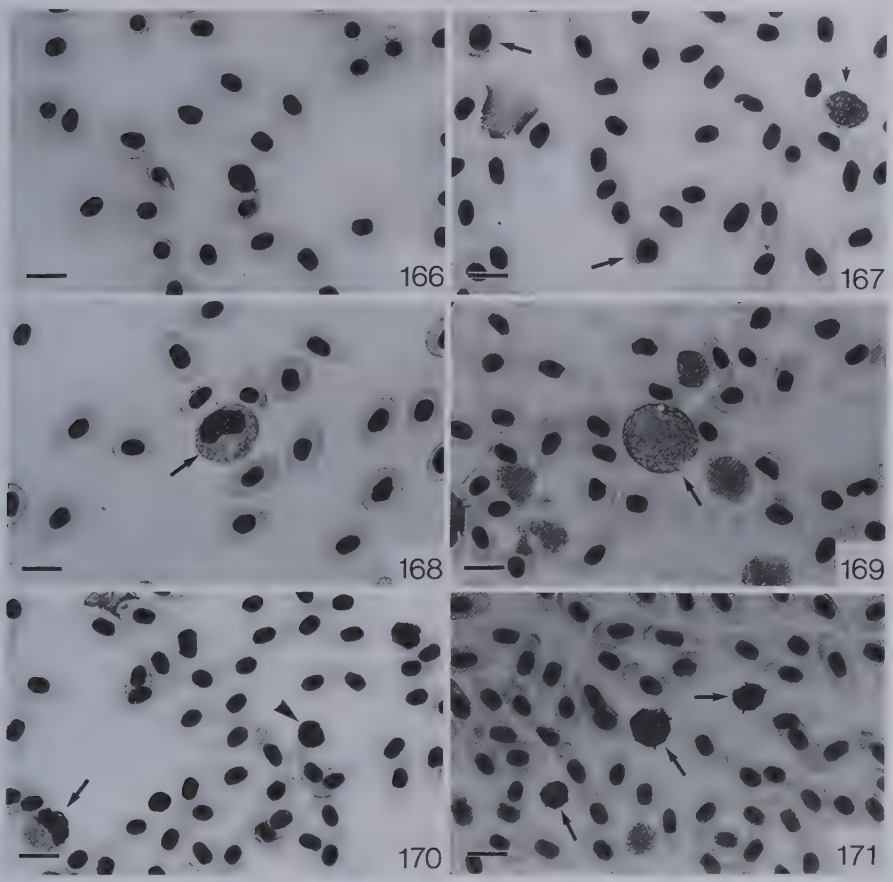


Fig.166. Blood cells of control fish, reared at 10℃ (May-Giemsa, bar=6μm).

Fig.167. Blood cells of diseased fish, reared at 5℃. Many immature erythrocytes (arrows) and small lymphocyte-like cells (arrow head) are found among the erythrocytes (May-Giemsa, bar=6μm).

Fig.168. Blood cells of an asymptomatic fish, reared at 10℃. Neutrophile (arrow) is found among the erythrocytes (May-Giemsa, bar=6μm).

Fig.169. Blood cells of diseased fish, reared at 10℃. Large lymphocyte-like cell (arrow) is found among the erythrocytes (May-Giemsa, bar=6μm).

Fig.170. Blood cells of an asymptomatic fish, reared at 15℃. Neutrophile (arrow) and lymphocyte-like cell (arrow head) are found among the erythrocytes (May-Giemsa, bar=6μm).

Fig.171. Blood cells of an asymptomatic fish, reared at 20℃. Many lymphocyte-like cells (arrows) are found among the erythrocytes (May-Giemsa, bar= 6μm).

南西水研研報
Bull. Nansei Natl. Fish.
Res. Inst. No.27, 233-241, 1994

マダイの胸腺リンパ球の活性に及ぼす各種ステロイドの影響

浜口　昌巳・薄　浩則・石岡　宏子

Effects of Steroids on Mitogenetic Response of Thymic Lymphocytes prepared from Red Sea Bream, *Pagrus major*

Masami HAMAGUCHI, Hironori USUKI, and Hiroko ISHIOKA

In order to clarify the relationship between steroids and immune response in red sea bream, *Pagrus major*, effect of three steroids on mitogenetic response of the thymic lymphocytes was determind *in vitro*. Red sea bream thymic lymophocytes without macrophages were cultured at 25 ℃ for 24 hr in the presence of phytohemagglutinin (PHA), pokeweed mitogen (PWM) and *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS). The mitogenicity of three mitogens to the thymic lymphocytes was determined by ^{3}H-thymidine incorporation into the thymic lymphocytes. The effect of three steroids, 17α-hydroxy-progesterone (17α-prog),corticosterone (CCS) and cortisol (CRS), on mitogenetic response of the thymic lymphocytes stimulated by PHA was also determined by the same method mentioned above. The mitogenetic activity of PHA was the highest among three mitogens. The mitogenetic responsibility of the thymic lymphocytes stimulated by PHA was strongly inhibited by CRS and CCS, and the former was rather effective than the latter.

Key words: red sea bream, thymic lymphocytes, steroid, phytohemagglutinin.

哺乳類では，生体は各種のストレスを受けることによって，様々な生理学的反応を起こすことが知られている。このようなストレス反応のうち，最初に表れる第一次反応としては血中への各種ホルモンの放出があり，ついでこれらの働きによって第二次反応として様々な生理学的反応が認められる（石岡1982，熊谷1983)。第一次反応で血中に放出されるホルモンのうち，副腎皮質系のコルチコステロイドはホルモンとしての本来の機能のほかに，胸腺に由来する細胞の分裂および活性を抑制する効果を持っており，生体の免疫系に様々な影響を及ぼすことが知られている（BAXTER 1976, MUNCK *et al* 1984，広川 1993)。胸腺は脊椎動物の細胞性免疫機構の中心的役割を演じるTリンパ球の分化および成熟の場として，個体の生体防御系に重要な役割を担っている。したがって，ストレス反応の一環として放出されたコルチコステロイドは，胸腺由来リンパ球の分裂および活性を抑制する作用によって免疫系による感染防御系

1994年1月19日受理，南西海区水産研究所業績A第29号，〒739-04　広島県佐伯郡大野町

に障害を与えることとなる。このように，内分泌系と免疫系は独立した系としてではなく，互いに影響し合いながら，それぞれが生体を維持するように作用している（広川 1993)。魚類においても各種ストレスにさらされた際には，血中のコルチコステロイドの一種であるコルチゾールの血中濃度が上昇することが知られている（石岡 1980, DONALDSON 1981, SCHRECK 1981)。また，魚類は独立した器官として胸腺を保有し，主要組織適合抗原に基づく移植片拒絶反応が認められていることから，哺乳類のTリンパ球機能領域を獲得した細胞が存在する可能性が大きいといえる。このことから，魚類においてもストレスにともなうコルチコステロイドの血中濃度の上昇は，この哺乳類のTリンパ球様細胞の活性を抑制し，感染防御系に影響を与えうるものと考えられる（MAULE et al 1989)。したがって，魚類リンパ球に対するコルチコステロイドの影響を調べることは，ハンドリングなどの各種ストレスが単独に，あるいは複合して負荷されることが多いと思われる養殖環境において，魚をいかに健康に育てていくかということを考えるうえで有用な知見が得られるものと思われる。

そこで，本研究では産業上重要種であるマダイを用いて3種のリンパ球分裂促進因子の効果を検討し，活性化に最も大きな効果が認められる因子を特定し，これによって刺激した胸腺リンパ球に及ぼすコルチコステロイド2種と，これらに類似した分子1種の計3種のステロイドの影響を試験管培養法によって検討した。

実　験　方　法

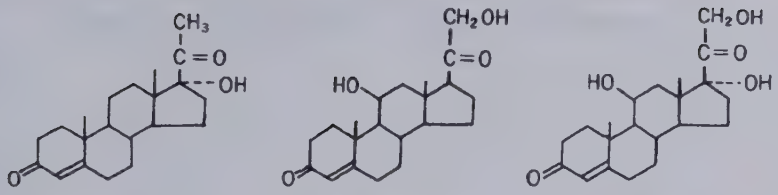
供試魚　1991年に広島県佐伯郡沖美町三高の養殖業者から購入した年齢2才，平均体重367gの養殖マダイ *Pagrus major*（TEMMINCK et SCHLEGEL）30尾を用いた。

細胞培養用培地　ライボビッツL 15培地（FLOW LABORATORIES社製）に0.39％のNaCℓ，5mMのHEPES(半井製薬社製)，100unit/mℓのペニシリンGおよび0.05mgのストレプトマイシン(いずれも明治製菓社製)，5％のウシ胎児血清を添加したもの（以下L-15）を用いた。

胸腺細胞浮遊液の調製　心臓から採血したのち，脳穿刺によって即殺したマダイの体表及び鰓蓋内壁を78％アルコールでよく消毒してから胸腺を摘出した。これをL-15中にてハサミで細片化した後，白金メッシュでろ過して組織片を除去し，浮遊細胞液を作製した。この細胞浮遊液から付着法によってマクロファージ等を除去した細胞をL-15培地で3回洗浄したのち，0.3％トリパンブルーを用いて生細胞数を血球計算盤（ERMA社製）によって計数し，同培地中に1.0×107細胞/mℓとなるように調製して胸腺細胞浮遊液とした。

リンパ球分裂促進因子およびステロイド　リンパ球分裂促進因子としてフィトヘマグルチニン-P（PHA，SIGMA社製)，ポークウィードマイトジェン（PWM，SIGMA社製)，大腸菌 *Escherichia coli* リポポリサッカライド（LPS，DIFCO社製）を用いた。ステロイドにはFig.1に示す17α-ヒドロキシ-プロジェステロン（17α-prog，WAKO社製)，コルチコステロン（CCS，WAKO社製)，コルチゾール（CRS，WAKO社製）を用いた。

リンパ球刺激因子による胸腺リンパ球の活性化の測定　24穴のカルチャープレート（NUNC



17α-hydroxy-progesterone (17α-prog)　Corticosterone (CCS)　Cortisol (CRS)

Fig. 1. Chemical structures of three steroids used in this study. Letters in parentheses are abbreviation of each steroid used in the present paper.

社製）の各ウェルに胸腺細胞浮遊液0.1mℓ，50～0.001μg/mℓの各段階濃度の3種類のリンパ球分裂促進因子を含むL-15を0.4mℓ添加し，20℃で48時間培養した後，各ウェルに最終濃度が7×10^4Bq/mℓとなるように^{3}H-サイミディンを添加し，さらに24時間培養した。培養後の細胞の処理は石岡・有馬（1989）の方法によって行った。放射活性は液体シンチレーションカウンター（Minaxiβ-4000，PACKARD製）で測定し，対照に分裂促進因子を含まないウェルの細胞を用いて下式によって刺激指数を算出した。

$$\text{刺激指数} = \frac{\text{リンパ球分裂促進因子の刺激ウエルでの放射活性}}{\text{対照ウエルの放射活性}}$$

胸腺リンパ球の活性化に及ぼす各種ステロイドの影響　エタノールに17α-progおよびCCSはそれぞれ400ng/mℓ，CRSは200ng/mℓとなるように溶解してステロイド液とした。胸腺リンパ球を最終濃度が1μg/mℓのPHAおよび20～0.01ng/mℓのステロイドを含むL-15で前項と同じ方法で培養し，放射活性を測定して刺激指数を算出した。対照にはPHAは含むが，ステロイドを含まないL-15，ブランクは両方とも含まないL-15で，それぞれ胸腺リンパ球を培養した後の放射活性とした。

結　　果

マダイの胸腺リンパ球を各種分裂促進因子を添加して培養したときの放射活性の変化をFig. 2に示す。PHAを濃度1μg/mℓとなるように添加した場合，放射活性は7690±4220（平均値±標準偏差）dpmとなり，無添加時および他の濃度と比較して有意に上昇した（$P<0.01$）。しかし，PWMおよびLPSでは最高濃度で放射活性が上昇する傾向を示したものの，両者ともに有意な差は認められなかった（$P>0.05$）。それぞれの刺激指数ではPHA 1μg/mℓで5.96±3.64となったのが最大で，PWMおよびLPSでは2を越えなかった（Table 1）。

胸腺リンパ球を1μg/mℓのPHAで刺激した時の放射活性に及ぼす各種ステロイドの影響をFig. 3に示す。PHAによって対照の放射活性はブランクより有意に上昇した（$P<0.01$）。ステ

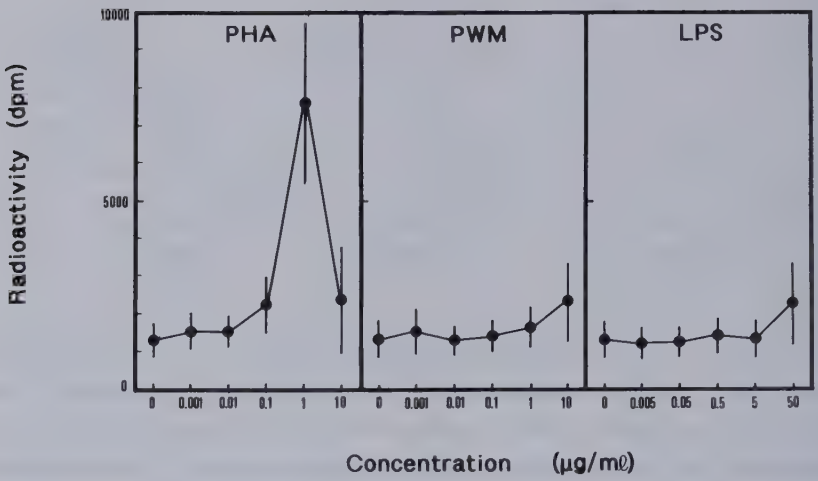


Fig. 2. Effects of mitogenetic substances on ^{3}H-thymidine incorporation in terms of radioactivity in the thymic lymphocytes of red sea bream, *Pagrus major*, *in vitro* (Mean±SD).
PHA : Phytohemagglutinin, PWM : Pokeweed mitogen,
LPS : *Escherichia coli* lipopolysaccharide,
dpm : Decay per minute.

Table 1. Effects of various mitogenic substances on stimulation index of thymic lymphocytes of red sea bream, *Pagrus majar*.

Mitogens	Number of fishes	Concentration (ng/mℓ)	Stimulation Index (Mean±SD)
Phytohemaggulutinin (PHA)	6	10	1.85±1.18
		1	5.96±3.64
		0.1	1.64±0.48
		0.01	1.10±0.12
		0.001	1.09±0.05
Pokeweed mitogen (PWM)	6	10	1.80±0.94
		1	1.17±0.19
		0.1	1.02±0.05
		0.01	0.90±0.05
		0.001	1.05±0.13
Lipopolysaccharide (LPS)	6	50	1.80±0.77
		5	0.97±0.21
		0.5	1.03±0.22
		0.05	0.94±0.15
		0.005	0.88±0.16

SD : Standard deviation

ロイド添加によって，17α—prog では20ng/mℓの濃度で対照に比べて放射活性が有意に低下し（$P<0.01$），リンパ球の活性化が阻害された。CCS では放射活性は0.2ng/mℓから低下する傾向

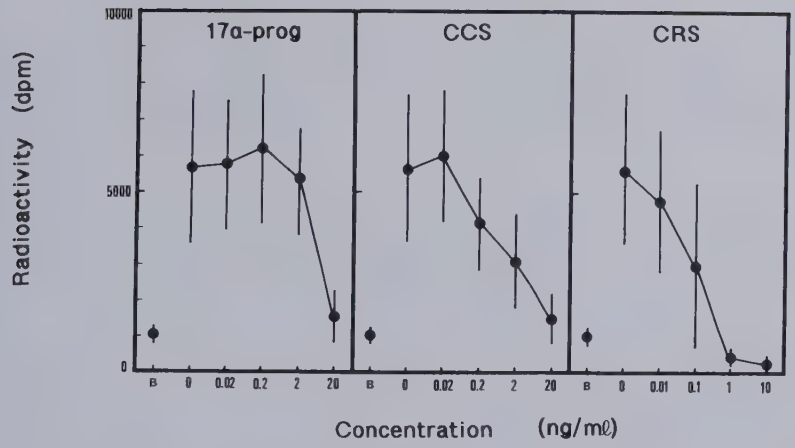


Fig. 3 Effects of mitogenetic substances on ^{3}H-thymidine incorporation in terms of radioactivity in the thymic lymphocytes of red sea bream, *pagrus majar, in vitro* (Mean ± SD).
PHA : Phytohomagglutinin, PWM : Pokeweed mitogen,
LPS : *Escherichia coli* lipopolysaccharide,
dpm : Decay per minute.

が認められ，20ng/mℓでは対照との間に有意な差が認められた（P<0.01）。CRSでは0.01ng/mℓの濃度からすでに放射活性が低下し，濃度が上昇するにつれてその度合は大きくなり，1 ng/mℓ以上では対照と比べて有意な差が認められた（P<0.01）。それぞれの刺激指数は17α-Progでは20ng/mℓでリンパ球の活性化の抑制が認められたが，それ以下の濃度では影響はなかった。CCSでは0.20ng/mℓ以上，また，CRSでは0.01ng/mℓ以上で抑制が認められた（Table 2）。

Table 2. Effects of various steroids on activation of thymic lymphocytes of red sea bream, *Pagrus majar*, stimulated by PHA.

Steroids	Number of fishes	Concentration (ng/mℓ)	Stimulation Index (Mean±SD)
17α-hydroxy-progesterone (17α-prog)	7	20	0.25±0.06
		2	1.00±0.16
		0.2	1.14±0.10
		0.02	1.06±0.13
Corticosterone (CCS)	7	20	0.14±0.08
		2	0.53±0.09
		0.2	0.80±0.17
		0.02	1.10±0.11
Cortisol (CRS)	7	10	0.04±0.02
		1	0.08±0.02
		0.1	0.49±0.29
		0.01	0.87±0.17

SD : Standard deviation.

考　　察

マダイの胸腺リンパ球の活性化に及ぼすステロイドの影響を調べるにあたって，まず各種リンパ球分裂促進因子の効果を検討した。哺乳類ではリンパ球分裂促進因子のうち，PHA はTリンパ球，PWM はTおよびBリンパ球，LPS はBリンパ球に作用することから，それぞれの因子はリンパ球のサブポピュレーションの同定に用いられている。今回の結果から，マダイの胸腺リンパ球は PHA でよく活性化し，1 μg/mℓの濃度で刺激指数が最大となったが，PWM および LPS に対する反応はいずれも刺激指数が 2 以下となり，PHA と比較して活性化の程度が低かった。このことから，マダイの胸腺リンパ球は哺乳類のTリンパ球に近い反応性をもったリンパ球で構成されているものと考えられた。ニジマス（*Oncorhynchus mykiss*）および channel catfish（*Ictalurus punctatus*），の胸腺細胞に対しては，Tリンパ球に指向性のあるリンパ球分裂促進因子のみが作用したとされている（Etlinger *et al* 1976, Ellsaesser 1988）。末梢血中のリンパ球であっても bluegil（*Lepomis macrochirus*）では胸腺由来抗原である Thy-1 様抗原を保有しているリンパ球群を除去した場合，PHA に対する反応性は低下した（Cuchens and Clam 1977）。また，ニジマスおよび channel catfish では，哺乳類のBリンパ球の特徴となる細胞表面抗体（sIg）を保有している細胞群はLPSに反応し，保有しない細胞群は PHA やコンカナバリン-A（Con-A）に反応したことが報告されている（Deluca *et al* 1983, Sizemore *et al* 1984, 浜口 1991）。さらに，西村（1993）はブリの胸腺特異抗原に対するモノクローナル抗体に反応する細胞群は Con-A によく反応したとしている。このように，魚類では胸腺細胞およびそれに関連すると思われる細胞は，Tリンパ球に指向性のあるリンパ球分裂促進因子に対して反応性を有し，胸腺由来のTリンパ球様のサブポピュレーションの存在が確認されている。しかし，魚類リンパ球の試験管内培養法によるサブポピュレーションの同定の結果は，培地成分、添加する血清の種類や量などによって左右されるので，Warr and Sarr それぞれの魚種にあった培地成分，血清の種類および添加量の検討など慎重を期す必要性はあるが，本研究結果はマダイにおいても，胸腺由来Tリンパ様細胞の存在を強く示唆するものである。

以上の結果を基にしてマダイの胸腺リンパ球を 1 μg/mℓの濃度の PHA で刺激したときの各種ステロイドの影響を検討したところ，個体差は大きいもののコルチコステロイドである CCS や CRS によって胸腺リンパ球の活性化が強く抑制されたことが明らかであるのに対し，性ホルモンに属する17α-progでは抑制効果は小さかった。CCS と CRS では CRS の方が低濃度で抑制効果が認められた。脊椎動物では，コルチコステロイドはタンパク質代謝，炭水化物代謝，電解質の代謝等にかかわる広範囲な生理活性を持つことが知られている。魚類に関してもそれらの機能が確認されているが，主として CRS を研究対象としたものが多い。石岡（1984）はマダイの血清中のコルチコステロイドは CRS が主体であることを確認している。したがって，試験管内で，マダイにおいて CCS より CRS が胸腺リンパ球の機能抑制効果が高かったことは，マダイのコルチコステロイドは CRS が主体であるので，CRS に対する感受性が高いことを示

すのではないかと考えられる。一方，白血球の持つグルココルチコイド（＝コルチコステロイド）のリセプターの数はストレスを受けた後の経過時間やストレスの種類によって変化することが知られており（MAULE and SCHRECK 1990, 1991），マダイにおいて各種ステロイドのTリンパ球の活性化抑制作用に個体差が大きかった理由としては各個体で供試前に受けたストレスの履歴の違いが影響している可能性がある。

石岡（1984）はマダイの各種ストレスに対する反応性を検討し，各種ストレスを与えたのちに血中のCRS量が上昇することを確認した。このことにより，CRSはマダイの体内で生体の適応反応の促進や維持に関与していることが推察されるが，本研究によって，マダイの胸腺リンパ球の活性を低下させて，分裂促進因子に対する反応を抑制することが明らかとなった。

魚類におけるコルチコステロイドの白血球やリンパ球に対する作用としては，数の減少（MCLEAY 1973, JOHANSSON-SJOBECK *et al* 1978, MAULE and SCHRECK 1990），機能の低下（TRIPP *et al* 1987）およびそれらの結果として生じる免疫応答や感染症に対する抵抗性の低下（MAULE *et al* 1987, KAATTARI and TRIPP 1987, THOMAS and LEWIS 1987, MAULE *et al* 1989）が上げられる。このようなことから，コルチコステロイドの長期の分泌が生体防御能を抑制し，感染症が発生しやすい条件を作り出すことは明白である。上記のとおり，マダイにおいてもCRSによって胸腺リンパ球の活性が抑制されることが明らかになったことから，ストレスがかかった場合には，それに適応するための生体反応の一環としてCRSの血中濃度が上がるが，同時に生体防御能の低下を誘導することになる。養殖現場においては，随時行われる網POTTINGER 1987, WEDEMEYER 197)。このように，養殖現場では魚体は自然環境下とは異なり，人為的な様々のストレスにさらされる。本研究により，養殖マダイに加わるこれらストレスの結果起こるとされる胸腺由来リンパ球の活性の低下の大きな原因がCRSの血中濃度の上昇であることが示された。

要　　約

ストレスの免疫系に及ぼす影響を調べるために，マダイの胸腺リンパ球を試験管内で培養し，その活性に及ぼすストレスによって血中濃度が上昇するコルチコステロイドの影響を調べた。

マダイの胸腺リンパ球は各種リンパ球分裂促進因子のうちポークウィードマイトジェン（PWM）や大腸菌リポポリサッカライド（LPS）に対してはほとんど反応しなかったが，フィトヘマグルチニン（PHA）に対してよく反応し活性化が認められた。このPHAによる胸腺リンパ球活性化は3種ステロイド，すなわち17α－ハイドロキシ－プロジェステロン（17α prog），コルチコステロン（CCS）およびコルチゾール（CRS）のうち副腎皮質ホルモンの1種であるCRSによって最もよく阻害された。このことから，ストレスにさらされたときのマダイにおける生体防御能低下の大きな要因がCRSであることが示された。

謝　　辞

本研究の遂行にあたり，種々の御協力を戴いた曽我梶枝さんに感謝の意を表します。

文　　献

BAXTER, J. D., 1976 : Glucocorticoid hormone action. *Pharm. Ther.* **B2,** 605-659.

DELUCA, D., M. WILSON, and G. W. WARR, 1983 : Lymphocytes heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri,* defined with monoclonal antibodies to IgM. *Eur. J. Immunol.,* **13,** 546-550.

CUHENS, A. M., and L. W. CLEM, 1977 : Phylogeny of lymphocyte heterogeneity II. differential effects of temperature on fish T like and B like cells. *Cell. Immunol.,* **34,** 219-228.

DONALDSON, E. M., 1981 : The pictuitary-interrenal axis as indicator of stress in fish. In "Stress and Fish" (A. D. Pickering, ed.), Academic Press, London, pp. 11-47.

ELLSAESSER, C. F., J. E. BLY, and L. W. CLEM., 1988 : Phylogeny of lymphocyte heterogeneity : the thymus of the channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.,* **12,** 787-792.

ETLINGER, H. M., H. O. HODGINS, and J. M. CHILLER, 1976 : Evolution of the lymphoid system. I. Evidence for lymphocytes heterogeneity in rainbow trout revealed by the organ distribution of mitogenic responses. *J. Immunol.,* 8, 67-73.

FLETCHER, G. L. (1975) : The effects of capture, "stress", and storage of whole blood on the red blood cells, plasma proteins, glucose and electrolytes of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Can. J. Zool.,* 53, 197-206

浜口昌巳，1991：ブリの細胞性免疫機構に関する研究．南西水研報，24，27-151.

広川勝是，1993：神経内分泌系による免疫機能調節．「神経・内分泌・免疫系のクロスト－ク」(広川勝是編)，学会出版センター，東京，3-12.

石岡宏子，1982：ストレス．「活魚輸送」(日本水産学会編)，恒星社厚生閣，東京，52－69.

石岡宏子，1984：マダイのストレス反応に関する生理生化学的研究．南西水研報，17，1-133.

石岡宏子・有馬郷司 (1989)：細胞、組織培養系による養殖魚のストレス判定に関する研究．科学技術庁昭和63年度アイソトープ平和利用研究成績年報，29，55-1－55-5.

JOHANSON－SJOBECK, M. L., G. DAVE, A. LARSSON, K. LEWANDR and U. LIDMAN, 1978 : Haematological effects of cortisol in European eel, *Anguilla anguilla L. Comp. Biochem. Physiol.,* 60, 165-168.

KAATTARI, S. L. and R. A. TRIPP, 1987 : Cellular mechanisms of glucocorticoid immunosuppression in salmon. *Fish Biol.,* 31(supplement A), 129-132.

熊谷　朗，1984：ストレスと適応病．医学のあゆみ，125(5)，300-303.

MAULE, A. G., R. A. TRIPP, S. L. KAATTARI and C. B. SCHRECK 1989 : Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshamytscha*) . *Gen. Comp. Endocrinol.*,120. 135-142.

MAULE, A. G. and C. B. SCHRECK, 1990 : Changes in numbers of leucocytes in immune organs of juvenile coho salmon after acute stress or cortisol treatment. *J. Aquat. animal Health,* 2, 298-304.

MAULE, A. G. and C. B. SCHRECK, 1990 : Glucocorticoid receptors in leucocytes and gill of juveniles coho salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen. Comp. Endocrinol.,* 77, 448-455.

MAULE, A. G. and C. B. SCHRECK, 1991 : Stress and cortisol treatment changed affinity and number of gluco-corticoid receptors in leucocytes and gill of coho salmon. *Gen. Comp. Endocrin.,* 84, 83-93.

MCLEAY, D. J., 1973 : Effects of cortisol and dexamethasone on the pituitary-interrental axis and abundance of white blood cell types in juvenles coho salmon, *Oncorhynchus kisutch.*

Gen. Comp. Endocrinol., **21,** 441-450.

MUNCK, A., P. M. GUYRE, and N. J. HOLBROOK, 1984 : Physiological functions of glucocorticoids in stress and their reactions to pharmacological actions. *Endocrinol. Rev.*, **5,** 25-44.

NISHIMURA, H., 1993 : Studies on the lymphocyte subpopulations of yellowtail, *Seriola quinqueradiata.* Kochi Univ. Master Thesis 1993, 1-106.

PICKERING, A. D., T. G. POTTINGER, and P. CHRISTIE (1982) : Recovery of the brown trout, Salmo trutta L., from acute handling stress : a time-course study. J. Fish Biol., **20**, 229-224.

PICKERING, A. D. and T. G. POTTINGER (1987) : Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite interrenal acclimation. *J. Fish Biol.*, **30,** 701-712.

SCHRECK, C. B., 1981 : Stress and compensation in the teleostean fishes : response to social and physical factors. In "Stress and Fish" (A. D. PICKERING, ed.), Academic Press, London, pp. 295-321.

SIZEMORE, C. R., N. W. MILLER, M. A. CUCHENS, C. J. LOBB, and L. W. CIEM, 1984 : Phylogeny of lymphocyte heterogeneity : the cellular requirements for in vitro mitogenic responses of channel catfish leucocytes. *J. Immunol.*, **133,** 2920-2930.

STRANGE, R. J., and C. B. SCHRECK (1978) : Anesthetic and handling stress on survival and cortisol concentration in yearling chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **35,** 345-349.

玉置文一，稲野宏志，鈴木桂子，1988：ステロイドホルモン．「ホルモンハンドブック」(日本比較内分泌学会編)，南江堂，東京，305-336.

THOMAS, P. and D. H. LEWIS, 1987 : Effects of cortisol on immunity in red drum, *Sciaenops ocellatus. Fish Biol.*, **31** (supplement A), 123-127.

TRIPP, R. A., A. G. MAULE, C. B. SCHRECK, and S. L. KAATTARI, 1987 : Cortisol mediated suppression of salmonid lymphocytes responses *in vitro. Dev. Comp. Immunol.*, **11,** 565-576.

WARING, C. P., R. M. STAGG, and M. G. POXTON (1992) : The effects of handling on flounder (*Platichthysflesus*L.) and Atlantic salmon (*Salmosalar* L.). *J. Fish Biol.*, **41**, 131-144.

WEDEMEYER, G. A. and W. T. YASUTAKE (1976) : Physiological response of juvenile coho salmon (*Salmogairdneri*) to handling and crowding stress in intensive fish culture. *J. Fish. Res. Board Can.*, **33,** 2699-2702.

南西水研研報
Bull. Nansei Natl. Fish.
Res. Inst. No.27, 243-249, 1994

室蘭産渦鞭毛藻 *Scrippsiella trochoidea* のシスト形成・発芽に及ぼす温度の影響

内田卓志

Effects of Temperature on the Encystment and Excystment of a Dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea* Isolated from Muroran Harbor, Hokkaido.

Takuji UCHIDA

The effects of temperature (5 ℃～22℃) on the encystment and excystment of a dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea* were investigated using a clonal culture obtained from Muroran Harbor, Hokkaido. Encystment was observed above 18 ℃ but not below 14 ℃ under a photoperiod of 14 hL : 10 hD. Vegetative cells showed good growth at temperatures above 14℃. Thus, cysts were formed under conditions favourable for vegetative growth. This may be a reasonable strategy for the survival of the population from the view that vegetative cells produce durable seeds before deterioration of the environment. The cysts of Muroran strain could germinate without low-temperature treatment which is necessary for the excystment of some other flagellates. The cysts could be preserved over 1 year at 5 ℃ in the dark. On the other hand, vegetative cells could not survive at 5 ℃. These findings suggest that *S. trochoidea* survives as cysts in Muroran Harbor during winter when seawater temperature is kept below 5 ℃. Excystment occurred at all temperatures tested, although germinated cells could not survive at 5 ℃. This character may be unfavourable in maintaining the population of this species. Further examinations are necessary to give ecological meanings to this character of *S. trochoidea*.

Key words : *Scrippsiella trochoidea*, cyst, encystment, excystment, temperature

植物性プランクトン個体群の消長を明らかにするためには，栄養細胞の増殖機構のみならず，生活史を通した研究が重要であることは，多くの研究者によって指摘されている（飯塚・入江1972, ANDERSON *et al*. 1983, 中原・左子 1987, 今井 1992)。特にシストを形成する種にとって，個体群の維持に果たすシストの役割は大きく，ブルーム形成の seed population, 低温期等条件の悪い時期における生残，底質への沈降による系外流出の回避，捕食圧からの回避などの役割が考えられている(中原・左子 1987)。従って，植物性プランクトンの生態を研究する場合，シストの存在の確認及びシスト形成・発芽条件の解明は極めて重要である。

Scrippsiella trochoidea (STEIN) LOEBLICH III は沿岸域に普通にみられる渦鞭毛藻類であ

1994年1月19日受理，南西海区水産研究所業績A第30号，〒739-04広島県佐伯郡大野町

り，石灰質の殻で覆われたシストを形成することが知られている（WALL *et al*. 1970）。本種は生息水域によって生理的特性の異なることが確認されており，地域による個体群の分化が著しい（WATANABE 1984）。これは地域への定着性が強く，個体群間における遺伝子交換，すなわち有性生殖が行われ難いことを示唆している。このような種は，地域により独自の消長パターンを繰り返している可能性が大きい。

S. trochoidea の栄養細胞は，北海道室蘭港において初夏から秋にかけて出現し，冬季には消失する（内田，未発表）。著者は本種の室蘭港における季節消長を生活史の面から明らかにするために，シストの形成・発芽条件を検討した。本報告においては，温度がシスト形成・発芽に及ぼす影響について述べ，併せて温度からみた本種の室蘭港における生態について考察する。

本研究を行うにあたって御指導及び御助言を戴いた，元北海道大学教授　故阪井典志雄先生に深謝致します。また，原稿の御校閲を賜った，南西海区水産研究所　赤潮環境部長　本城凡夫博士に謝意を表します。

材料及び方法

実験に用いた *Scrippsiella trochoidea* の培養株は1977年9月に室蘭港において採取した海水から，マイクロピペット洗浄法により得られたクローン株である（内田 1991）。培養液は濾過海水を栄養強化したもの（BSW 4, UCHIDA 1981）を用い，培養器としてねじ口蓋付試験管（18×130mm）あるいは，100m*l* 容三角フラスコを使用した。また，シスト形成及び発芽の観察にはマルチウエルプレート（コースター社製24穴付，各穴2m*l* 容）を用いた。培養条件は照度2,000～3,000 lx，照明時間は1日14時間とし，温度は5℃，10℃，14℃，18℃，22℃に設定した。

シスト形成に及ぼす温度の影響

14℃で培養した対数増殖期にある栄養細胞を1m*l* 中40－100細胞接種し，各設定温度で15日間培養した後，形成されたシスト及び遊泳細胞を顕微鏡下で計数した。計数には，罫線入りスライドを用いた。

シストの休眠期間

シストの前駆体である，大型で色素の濃い細胞（Fig. 1 a）を2m*l* の培養液を入れたマルチウエルプレートに単離し，シスト（Fig. 1 b）を形成するまで毎日明期に観察した。形成されたシストをただちに別のマルチウエルプレートに各穴1個体ずつ単離し，発芽過程を観察した。温度は22℃とし，光条件は明条件（1日14時間照明）及び暗条件（マルチウエルプレートをアルミホイルで包装）の二通りに設定した。

低温，暗条件下におけるシストの耐性

22℃において形成されたシストを5℃，暗条件で保存し，3カ月後，1年後，及び2年後にそれぞれ約100個体を22℃，1日14時間照明の条件に移して培養し，12日後に発芽率を求めた。発芽はFig. 1 d-eに示した発芽細胞を確認することにより判定した。

シスト発芽に及ぼす温度の影響

22℃で形成されたシストを5℃，暗条件下で約2カ月保存した後，5℃～22℃，14時間照明の条件下で培養し，14日後に各温度における発芽率を求めた。

結　　果

シスト形成に及ぼす温度の影響

5℃から22℃の各温度におけるシスト形成及び栄養細胞の増殖の有無を，それぞれTable 1，

Table 1. Effects of temperature on the encystment of the Muroran strain of *Scrippsiella trochoidea*.

Temperature	5℃	10℃	14℃	18℃	22℃
Encystment	−	−	−	+	++

− : encystment did not occur, + : less than 10 cysts/m*l*,
++ : 50～200cysts/m*l*.

Table 2. Vegetative growth of the Muroran strain of *Scrippsiella trochoidea* under various temperatures.

Temperature	5℃	10℃	14℃	18℃	22℃
Vegetative growth	−	+	++	++	++

− : cells died, + : 1,000～3,000cells/m*l*,
++ : 6,000～10,000cells/m*l*.

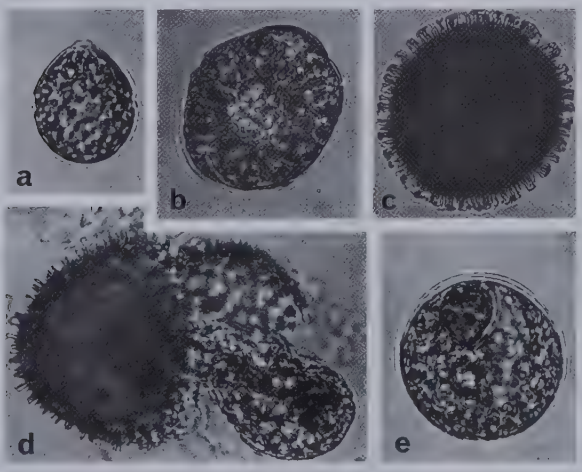


Fig. 1. Encystment and excystment of *Scrippsiella trochoidea*. a: vegetative cell, b: pre-encystment cell, c: typical calcitic spiny cyst, d: excystment, e: germinated cell from cyst., magnification of a-e: ×1,100.

2に示す。シスト形成は18℃，22℃の温度でみられ，22℃で最も活発であったが，14℃以下では観察されなかった。シスト形成は栄養細胞接種後，7～10日目位から観察され始めた。すなわち，渡辺他（1982）が播磨灘から単離した株で明らかにしたように，大型で暗褐色の遊泳細胞が動きを停止した後，表面に刺のある厚膜を形成し，シストとなった（Fig. 1b, c）。

栄養細胞の生長は10℃以上でみられ，14℃～22℃で活発であった。これに対して5℃では栄養細胞は生長せず，すべて死滅した。

シストの休眠

形成直後のシストを22℃，1日14時間照明の条件において培養し，発芽に要する日数を測定した。その結果，発芽はシストを形成してから，26～53日後に観察された。このように，個体による差はあるものの，シストの成熟・発芽にはある程度の休眠期間が必要と考えられる。

暗条件において培養したシストは，単離してから2カ月後でも発芽は認められなかった。この結果からシストの発芽には光が必要であり，シストの保存は暗条件に置くことが有効であると考えられた。

低温・暗条件下におけるシストの耐性

一般的に植物性プランクトンのシストはその種が不適な環境を過ごすための生活環段階であり，シストを形成する種は海底においてシストの状態で越冬している可能性が強い。ここでは，低温・暗条件下におけるシストの耐性について明らかにするため，5℃，暗条件下で一定期間保存したシストについて発芽率を調べた。その結果（Table 3），シストの発芽率は3カ月後と1年後では，それぞれ47%，38%と大きな差はなかったが，2年後には3%と著しく低下していた。

Table 3. Germination rate of cysts of Muroran strain of *Scrippsiella trochoidea* preserved at 5 ℃ in the dark.

Preservation period	3 months	12 months	24 months
Germination rate (%)	47	38	3

シスト発芽に及ぼす温度の影響

5～22℃各温度におけるシストの発芽の有無をTable 4に示す。シストの発芽は試験した温度全てにおいて観察されたが，5℃では発芽細胞はすべて死滅し，栄養細胞の増殖には至らなかった。これに対して10℃以上では発芽細胞の分裂により，栄養細胞の増殖が得られた。

Table 4. Effects of temperature on the excystment of the Muroran strain of *Scrippsiella trochoidea*.

Temperature	5 ℃	10℃	14℃	18℃	22℃
Encystment	±	+	+	++	++

± : cysts germinated but germlings did not survive,
\+ : less than 10% cysts germinated,
++ : more than 30% cysts germinated.

考　　察

本研究で用いた室蘭産 *Scrippsiella trochoidea* のシストは18℃以上で形成され，14℃以下では観察されなかった。しかし，渡辺他（1982）は本種の播磨灘株が10℃～30℃の広い温度範囲でシストを形成することを報告している。このように同一種でも生息する地域によってシスト形成や増殖の最適条件等の生理的な性質が異なることは，渡辺（1984）が *S. trochoidea* の播磨灘株と大船渡株を用いて明らかにしている。これらの結果は，同一種でも地域ごとに個体群が分化しており，環境条件に対する応答など生態的な特性が異なることを示している。

室蘭株のシストが形成される温度条件は，遊泳細胞の増殖にも好適であり，遊泳細胞の増殖が活発な時期にシスト形成が行われることが明らかとなった。この点，同種の他株で報告されている研究結果と一致する（WALL *et al*. 1970，渡辺他 1982，渡辺 1984）。したがって *S. trochoidea* の場合，温度からみれば，増殖条件が悪くなってからシストを形成するのではなく，増殖条件の良い時期にシストを形成し，増殖条件の悪い時期に備えるという生存様式を持つものと考えられる。このように栄養細胞の増殖に好適な条件でシスト等の休眠胞子を形成する例は幾種かの鞭毛藻類で知られており，確実に次世代を残すことができる点で有利である（中原・

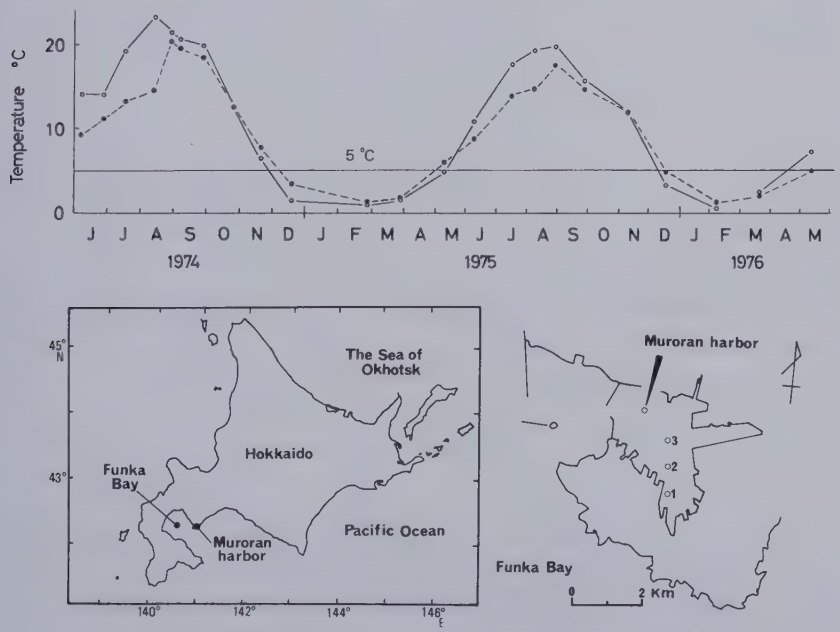


Fig. 2. The annual change of seawater temperature of Muroran Harbor, Hokkaido (a) and the location of Muroran Harbor (b) (Uchida 1981). a: each surface (○) and bottom (●) seawater temperature is an average value of the three stations indicated in b. b: depth of the three stations was 7-14m.

左子 1987)。室蘭港における水温の周年変化をみると（Fig. 2, UCHIDA 1981），18℃以上になる時期は表層で7～9月であり，温度からみた限りではこの時期に *S. trochoidea* のシスト形成が行われていると推察される。

本株のシストは，形成時と同じ温度条件で発芽した。発芽までに要した期間は22℃，1日14時間照明の条件下で26～53日であった。渦鞭毛藻類のシストの休眠期間は淡水藻である，*Peridinium gatunense* の12時間という極めて短い例もあるが（PFIESTER 1977），通常数週間から6カ月程度であること（PFIESTER and ANDERSON 1987）から考えると，本株の場合は平均的な値と言える。また，他の鞭毛藻類では，シストの発芽に一定期間低温に置くなど，休眠を解除するための処理が必要な場合があるが（左子 1985, 今井 1990），本株のシストは形成時と同じ培養条件下で成熟・発芽し，休眠解除のための処理は特に必要としなかった。したがって天然において，本株のシストは冬季の低温期間を経ないでも，光その他の環境条件が整えば発芽可能と考えられる。

温度耐性について調べたところ，本株のシストは5℃暗条件において1年間保存したもので38%，2年間保存後も3%のシストが発芽可能であり，低温耐性の強いことが明らかとなった。これに対して遊泳細胞は5℃ではすべて死滅したことから，5℃以下の低温に対する耐性はないと判断される。Fig. 2に示したように，室蘭港における水温は12月～4月には表層，底層ともに5℃以下となる。したがって，本株の遊泳細胞は室蘭港において越冬することは不可能であることから，港内における遊泳細胞の出現が港外からの移入に依存しているのでなければ，本株はシストの形態で越冬していると考えるのが妥当である。

シストの発芽は5～22℃の広い温度条件で観察された。室蘭港の水温は5～11月がほぼこの温度範囲にあることから（Fig. 2），この時期に光その他の環境条件が満たされれば，本株のシストは発芽できるものと考えられる。ただし，5℃ではシストの発芽は可能であるものの，その結果生じた発芽細胞は生存することができなかった。これは，本株のシストは必要な条件が整えば，その後の遊泳細胞の生存に関わりなく発芽することを示しており，個体群の維持という面からは不利な特性であると言わねばならない。この点については，今後さらに生態的な適応の観点から検討を重ねる必要がある。

文　献

ANDERSON, D. M., S. W. CHISHOLM and C. J. WATRAS, 1983：Importance of life cycle events in the population dynamics of *Gonyaulax tamarensis*. *Marine Biology*, **76**, 179-189.

飯塚昭二・入江春彦, 1972：大村湾の赤潮発生環境と発生要因.「内湾赤潮の発生機構（入江春彦他編）」, 日本水産資源保護協会, 東京, 35-57.

今井一郎, 1990：有害赤潮ラフィド藻 *Chattonella* のシストに関する生理生態学的研究. 南西水研報, **23**, 63-166.

今井一郎, 1992：瀬戸内海のシャットネラ赤潮におけるシストの生態的役割. 月刊海洋, **24**, 33-42.

中原紘之・左子芳彦, 1987：淡水植物プランクトンの生活史.「淡水赤潮（門田元編）」, 恒星社厚生閣, 東京, 21-77.

PFIESTER, L. A., 1977 : Sexual reproduction of *Peridinium gatunense* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **13,** 92-95.

PFIESTER, L. A. and D. M. ANDERSON, 1987 : Dinoflagellate reproduction. In "The biology of dinoflagellates." ed. TAYLOR, F. J. R., Blackwell, Oxford, 611-648.

SATO, Y., Y. ISHIDA, H. KADOTA and Y. HATA, 1985 : Excystment in the freshwater dinoflagellate *Peridinium cunningtonii. Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 267-272.

UCHIDA, T., 1981 : The relationships between *Prorocentrum micans* growth and its ecological environment. *Sci. Pap. Inst. Algol. Res. Fac. Sci. Hokkaido Univ.*, **7** 17-76.

内田卓志, 1991 : 室蘭産 *Scrippsiella trochoidea* の有性生殖. 日水誌, **57,** 1215.

WALL, D., R. R. L. GUILLARD, B. DALE, E. SWIFT and N. WATABE, 1970 : Calcitic resting cysts in *Peridinium trochoideum* (STEIN) LEMMERMANN, an autotrophic marine dinoflagellate. *Phycologia,* **9,** 151-156.

渡辺信, 1984 : 渦鞭毛藻 *Scrippsiella trochoidea* の有性生殖と培養株間にみられた生理的分化について.「有性繁殖を行う藻類の種個体群における生活環制御様式と種の分化」昭和58年度文部省科学研究費補助金（総合A）研究成果報告書（研究代表者：舘脇正和）,33-42.

渡辺信・渡辺正孝・福代康夫, 1982 : 赤潮鞭毛藻類のシスト形成と発芽 I. *Scrippsiella trochoidea* におけるシスト形成の誘導条件について. 国立公研報, **30,** 27-42.

南西水研研報
Bull. Nansei Natl. Fish.
Res. Inst. No.27, 251-394, 1994

Gymnodinium nagasakiense の赤潮発生機構と発生予知に関する生理生態学的研究

山口峰生

Physiological Ecology of the Red Tide Flagellate *Gymnodinium nagasakiense* (Dinophyceae) — Mechanism of the Red Tide Occurrence and its Prediction —

Mineo YAMAGUCHI

During the summer of 1965, a huge bloom of the dinoflagellate *Gymnodinium nagasakiense* Takayama et Adachi, named *Gymnodinium* type-'65 at the time, occurred in Omura Bay in Kyushu, the western part of Japan, and caused mass mortality of cultured and feral fish. Since then, *G. nagasakiense* red tide has frequently occurred in the coastal waters of western Japan. The present study was done to establish the biological background for the elucidation of the mechanism of *Gymnodinium* red tide and its prediction. The major factors involved in the red tide outbreaks were examined by a field survey, the growth responses of the organisms to physico-chemical factors in culture were observed, and the cell cycle of the organism was determined to develop a technique for estimating the species-specific in situ growth rate.

The chromosome number of *G. nagasakiense* was examined for clonal cultures from different origins; i.e., Suo-Nada, Hiroshima Bay, Uranouchi-Inlet and Gokasho-Bay. *G. nagasakiense* had rod-shaped chromosomes that measured about 10～20 μm long and 1.5～2 μm wide. There was no significant difference in chromosome counts for the cultures from different waters. The chromosome number of *G. nagasakiense* was 113±5 (mean±SD, n-105). This indicated that the chromosome number in this species was stable and should be valuable for the taxonomy of the organism.

Distribution of the vegetative cells and environmental factors concerning the red tide outbreaks was investigated in Suo-Nada, western Seto Inland Sea from 1985 to 1987. Important factors causing the huge bloom of *G. nagasakiense* were the marked decrease of the salinity of the surface layer by heavy rainfall, increase of vertical stability caused by a development of halocline and formation of large scale anoxic bottom water. Frequent observation of the sea water from Uranouchi-Inlet, Kochi Prefecture, confirmed that vegetative cells of *G. nagasakiense* occurred throughout the year.

The effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of this organism were examined using axenic cultures to evaluate the relative importance of these factors on the dynamics of natural populations. *G. nagasakiense* grew at a low irradiance of 10 μEm $^{-2}$s $^{-1}$ and more and the growth was saturated at 110 μEm $^{-2}$s $^{-1}$. The growth response to light allowed them to dominate in the low light conditions such as subsurface layer and bad weather in the rainy season. The growth of the flagellate was examined in 25 different combinations of temperature (10 to

1994年1月19日受理，南西海区水産研究所業績A第31号，〒739 04広島県佐伯郡大野町

30℃) and salinity (10 to 30 ‰) under saturated irradiance. Growth occurred at temperatures from 10 to 30 ℃ and at salinities from 15 to 30 ‰. The highest growth rate was observed in the combination of 25℃ and 25 ‰, respectively. The tolerable salinity range of growth was relatively wide at an optimum temperature and was reduced to a much narrower range at a sub-optimum temperature. These findings indicate that *G. nagasakiense* is an eurythermal and euryhaline organism. These physiological characteristics presumably allow them to endure the winter as motile cells, which in turn act as the seed population for initiating the red tide in the following summer.

G. nagasakiense could utilize both inorganic and organic nutrients (nitrate, ammonium and urea as N sources and orthophosphate and glycerophosphate as P sources). Minimum cell quotas (Q) for nitrogen and phosphorus of the organism were 3.7～4.0 pmol cell^{-1} and 0.23～0.35 pmol cell^{-1}, respectively. On the basis of these values and in situ nutrient (DIN and PO_4-P) concentrations the growth potentials of natural sea water were evaluated. The growth potentials of the seawater from Suo-Nada and Uranouchi Inlet ranged from 100 to 8300 cells ml^{-1}. Therefore *G. nagasakiense* red tide may occur at the ordinary level of nutrients in a natural environment. The relationship between nutrient concentrations and growth rate followed Monod's equation. The half saturation constant for growth (K_s value) was 0.58～0.78μM for nitrogen and 0.14～0.15μM for phosphorus. These values were smaller than those of other dinoflagellates reported previously. This indicates that *G. nagasakiense* requires a very low concentration of nutrients for their growth, which is a characteristic allowing it to grow more abundantly than its competitors in the natural environment.

The diel pattern of cell division of *G. nagasakiense* was examined in a laboratory experiment under various light and temperature conditions on light:dark (L:D) cycles (L 05:00 to 19:00 h). *G. nagasakiense* exhibited a distinct phased cell division on the L:D cycles, with the maximum frequency of 2 nuclei stage at 22:00 h and that of paired cells at 04:00 to 06:00 h. Cell division generally occurred at the end of the dark period and its pattern was independent of light intensity and temperature. On the basis of these observations, the applicability of the frequency of dividing cells (FDC) technique for estimating growth rate of *G. nagasakiense* was examined. The duration of cell division (T_d), a parameter necessary for the calculation of growth rate, was determined for two different cell division stages; i.e., 2 nuclei and paired cells. Calculated T_d value from the frequency of paired cells was 1.09±0.16 h and stable for the population grown under different light intensities. On the other hand, the T_d estimated from the frequency of 2 nuclei varied markedly. The growth rate estimated by the FDC technique using T_d from paired cells correlated significantly with those calculated from the increase in cell number. The T_d value was affected by temperature. However, a statistically significant log-linear relationship was obtained between T_d and temperature. Using the relationship, T_d at the desired temperature could be obtained.

To determine the phased cell division and to estimate in situ growth rate of *G. nagasakiense* by the FDC technique, field sampling was conducted in Suo-Nada and Hiroshima Bay. Natural populations of *G. nagasakiense* showed distinct phased cell division as in the laboratory conditions with the maximum frequencies around midnight. Using the FDC of the natural population and T_d values calculated from in situ temperatures, the growth rates were estimated to be 0.12～0.14 divisions day^{-1} for Suo-Nada and 0.27～0.52 divisions day^{-1} for Hiroshima Bay populations, respectively.

To improve the FDC technique, DNA synthesis and the cell cycle in *G. nagasakiense* were investigated by determining the relative DNA contents of individual cells using an epifluorescence microscopy-based microfluorometry system. The nuclei were stained with the DNA-specific fluorochrome 4',-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Nuclear DNA contents, cell size distribution, cell density, and frequency of paired cells were determined every 2 h for 24 h using cells grown on a 12h L:D cycle. DNA synthesis and cell division were tightly phased to a particular period of the L:D cycle. DNA synthesis (S phase) occurred from 10:00 to 22:00 h and was followed by cytokinesis. The presence of such a distinct S phase strongly suggests that *G. nagasakiense* has a typical eukaryotic cell cycle, which makes it possible to estimate the species-specific in situ growth rate based on the diel pattern of DNA synthesis.

To examine the effect of temperature on the cell cycle, *G. nagasakiense* cells were cultured at 5 different temperature conditions (10～30℃) and the DNA content was determined using microfluorometry. Patterns of the change in percentages of G_1 phase cell showed a sine curve at the temperature of more than 20℃. From the time interval of the peaks of the curve, the generation time of the species was estimated to be 24 h. These patterns become obscure at low temperatures. Based on the percentages of the cell cycle phase (G_1, S, G_2+M) durations of cell cycle phases at various temperatures were calculated. It was concluded that all phases of the cell cycle were affected by temperature and were increased with decreasing temperature. Low temperature caused an increase in cell size. Cells with 4C DNA were observed at 10℃. This indicated that diploidy occurred at a low temperature. The natural population of *G. nagasakiense* was also found to grow under the same cell cycle progression as in the laboratory conditions. These findings suggest that the method for species-specific growth rate using the diel DNA synthesis cycle is applicable to the natural populations.

The present study revealed that *G. nagasakiense* could grow under a very wide range of environmental factors (light, temperature, salinity and nutrients). Based on these growth characteristics the biological phase of *G. nagasakiense* red tide and the factors affecting red tide development were summarized as follows. First, the seed population of the red tide was thought to overwintered vegetative cells. They grew gradually and their number increased with increasing water temperature. The population grew at nearly the maximum growth rate (1.0 division day^{-1}) into red tide under the favorable conditions where low salinity and supply of nutrients by heavy rainfall in the rainy season, decrease of competitors by low irradiance, increase of temperature and irradiance after the rainy season, increase of vertical stability and decrease of grazing pressure. Physical and biological accumulation might increase the cell density in the red tide. After the red tide, the vegetative cells overwinter and play an important role in initiating the red tide of the following summer.

On the basis of these biological characteristics of *G. nagasakiense* several plans for the prediction of the red tide are proposed. First, simulation using an ecological model is appropriate for long term predictions. Biological parameters for the relationship between growth rates and environmental factors obtained in the present study are useful for this purpose. Second, monitoring in situ growth rate of the organism by the newly developed FDC technique or cell cycle analysis might be a useful indicator for the short term prediction of the red tide.

Key words: *Gymnodinium nagasakiense*, Red tide, Chromosome number, Growth physiology, Growth rate, Cell cycle.

目　　次

第Ⅰ章　序　論 ……254
第Ⅱ章　染色体数による *Gymnodinium nagasakiense* の分類学的検討 ……258
第Ⅲ章　現場海域における *Gymnodinium nagasakiense* の出現特性 ……266
　第１節　夏季の周防灘における赤潮発生と環境要因 ……266
　第２節　浦ノ内湾における出現の季節変化 ……284
第Ⅳ章　*Gymnodinium nagasakiense* の増殖に及ぼす物理・化学的要因 ……288
　第１節　*G. nagasakiense* の増殖に及ぼす光強度，水温及び塩分の影響 ……289
　第２節　競合赤潮ラフィド藻 *Chattonella* spp. の増殖生理 ……297
　第３節　珪藻類の増殖生理 ……307
　第４節　*G. nagasakiense* の増殖に及ぼす栄養塩（窒素，リン）の影響 ……316

第Ⅴ章　*Gymnodinium nagasakiense* の増殖速度の測定 ……331
　第１節　培養条件下における増殖速度測定法の検討 ……332
　第２節　現場海域における同調分裂と増殖速度 ……341
第Ⅵ章　*Gymnodinium nagasakiense* の細胞周期 ……346
　第１節　核ＤＮＡ量測定法の確立 ……347
　第２節　培養条件下における細胞周期 ……354
　第３節　細胞周期に及ぼす温度の影響 ……360
　第４節　現場個体群の細胞周期 ……370
第Ⅶ章　総　括 ……375
摘　要 ……379
謝　辞 ……382
文　献 ……382

第Ⅰ章　序　論

わが国の水産物の消費は国民食生活の健康志向，グルメ志向などによる需要に支えられ，近年順調に推移している。しかし，水産物の供給面でみると，1977年に始まる200海里時代への突入以降，国際漁業規制の強化や漁業資源水準の悪化により，遠洋及び沖合い漁業の生産量は減少している。したがって，将来にわたる水産物の安定供給及び漁業経営の安定のためには，資源管理型漁業や栽培漁業の推進等により，沿岸漁業の維持・振興を図る必要がある。

このような背景の中で海面養殖業は増加傾向にあり，1989年におけるその生産量は127万トン，金額では5,700億円に上っている（農林水産省統計情報部 1990）。これは総漁業生産量の11%，金額では21%に相当するものである。ところが，その生産の場となる沿岸海域においては，産業・生活排水の流入に伴う水質環境の悪化及び富栄養化が進行し，赤潮や貧酸素水塊及び油濁による漁業被害が後を絶たない。このため，沿岸水産資源の保護，水産物の安全性の確保等の観点からも，漁場の環境保全がますます重要な課題となっている。

赤潮は漁業被害をもたらす原因の中で最も重大なものである。赤潮現象は水域中で主として植物プランクトンが大増殖し，そのために水の着色が起こる現象である。歴史的に見ると赤潮自体は古くから知られている現象であるが，1960年代後半からその発生件数の増加，構成種の多様化及び分布の広域化が見られ，さらに沿岸域における水産増・養殖業に深刻な被害を与え始めたことから，産業的・社会的にも非常に注目されるようになった。

わが国における赤潮原因生物のうち，多大な漁業被害をもたらしている有害種の代表的なものとして，*Chattonella* 属と *Gymnodinium nagasakiense* *が挙げられる。瀬戸内海域における

* 本種の種名に関して *Gymnodinium nagasakiense* は *G. mikimotoi* の同種異名であり，前者は後者の新参シノニムとする報告がなされた（高山・松岡，1991：日本プランクトン学会報 38，53-70.）。

G. nagasakiense の赤潮は1957年11月の山口県徳山湾における発生が最初のようである（池田他 1987）。しかし本種が重大な有害赤潮生物として認識されるようになったのは，1965年の長崎県大村湾における大規模な赤潮とそれによる漁業被害が契機となっていることは間違いない（飯塚・入江 1966, TAKAYAMA and ADACHI 1984）。1972年以降に瀬戸内海及びその周辺海域（熊野灘と土佐湾を含む）で発生した漁業被害を伴う赤潮の発生件数と，その中で占める *G. nagasakiense* 赤潮による被害件数をFig. 1-1に示した（水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 1973 1990）。ここ10年間の被害件数は1970年代に比べてやや減少しているが，依然として毎年10件程度の漁業被害が続出している。その内 *G. nagasakiense* による漁業被害は年平均5件程度であるが，近年その割合が増大する傾向がうかがえる。瀬戸内海域とその周辺海域における本種による主な被害事例をTable 1-1にまとめた（水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 1973 1990）。とりわけ1984年の熊野灘及び1985年の周防灘における赤潮が顕著で，漁業被害はそれぞれ43億円及び10億円に上っている（水産庁他 1986，水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 1986）。瀬戸内海以外では九州沿岸域での被害が多く，1989年には八代海で2億6,000万円に及ぶ被害が報告されている（水産庁九州漁業調整事務所 1990）。浜名湖でも1990年の赤潮でカキ養殖に重大な被害が及んでいる（静岡県水産試験場浜名湖分場　私信）。一方，韓国（CHO 1981, LEE and KWAK 1986）や香港（WONG 1989）など近隣諸国でも被害例が報告されており，*G. nagasakiense* 赤潮は国内だけの問題に留まらない。このように *G. nagasakiense* は *Chattonella* 属と並んで極めて有害な赤潮生物であると言える。

G. nagasakiense は渦鞭毛藻綱（Dinophyceae）ギムノディニウム目（Gymnodiniales）ギムノディニウム科（Gymnodiniaceae）に属する単細胞性の藻類である。本種の細胞長は18～37

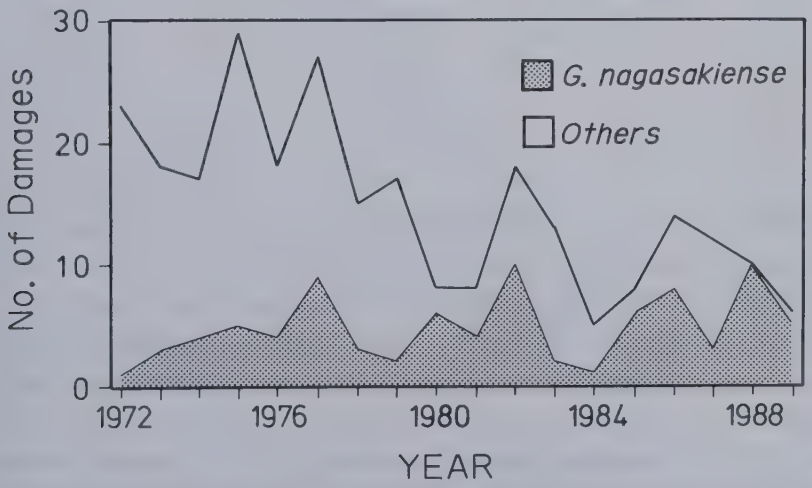


Fig.1-1. Yearly trends in red tide outbreaks accompanied by damage to fisheries in the Seto Inland Sea and the adjacent sea from 1972 to 1989. Dotted area indicates the number of fishery damages resulting from red tide by *G. nagasakiense*.

Table 1-1. Incidence of red tide outbreaks of *G. nagasakiense* and related damages to fishery in the Seto Inland Sea and adjacent sea from 1972 to 1989.

Year	Month	Locality	Fish damaged	Amount of loss (1,000yen)
1972	May	Kii Suido	Yellowtail	9,500
1973	Sep.	Harima Nada	Clam	1,000
1974	Aug.	Hiuchi Nada		17,000
1976	Sep.	Bungo Suido	Yellowtail, Abalone	17,475
1977	July	Kii Suido	Pearl oyster	163,050
	Aug.	Hiroshima Bay	Black porgy	180,160
1979	Aug.	Aki Nada, Harima Nada Suo Nada, Bungo Suido	Yellowtail, Clam, Red sea bream	796,584
1980	July	Kumano Nada	Yellowtail, Abalone	366,821
	Aug.	Suo Nada, Bungo Suido	Mullet, Yellowtail	23,499
1981	June	Bungo Suido	Abalone	173
	July	Bungo Suido	Yellowtail	71,512
1982	July	Suo Nada, Iyo Nada	Octopus, Egg cockle, Abalone	60,394
	Aug.	Iyo Nada, Bisan Seto Hiuchi Nada	Puffer, Yellowtail	238,221
1983	Aug.	Bungo Suido, Tosa Bay	Yellowtail, Red sea bream	26,020
1984	July	Kumano Nada	Red sea bream, Pearl oyster	4,361,609
1985	July	Suo Nada, Iyo Nada Bungo Suido	Clam, Red sea bream, Yellowtail Prawn	954,333
1986	July	Suo Nada, Iyo Nada Bungo Suido	Yellowtail, Prawn, Flatfish	158,791
	Aug.	Iyo Nada, Aki Nada Bungo Suido	Yellowtail	9,142
	Sep.	Suo Nada	Bastard halibut	174
1987	June	Kii Suido	Yellowtail	19,800
	Aug.	Bungo Suido	Horse mackerel	2,500
1988	July	Kii Suido	Yellowtail	1,900
	Aug.	Kii Suido, Tosa Bay	Yellowtail, Mackerel, Pike eel Amberjack, Top shell	20,723
1989	July	Tosa Bay	Yellowtail	6,600
	Aug.	Iyo Nada	Flatfish	4,463
			Total	7,511,444

μm，細胞幅は14～35 μmで，背腹に偏平である（Fig. 1-2）。これらの形態的特徴に関してはTAKAYAMA and ADACHI（1984）に詳述されている。本種についても他の赤潮生物同様その分類に混乱があった。本種は当初 *Gymnodinium* sp.，*Gymnodinium* sp.1, *Gymnodinium* sp.（'65年型種），*G. nagasaki* などと仮称されていたが，TAKAYAMA and ADACHI（1984）によって *G. nagasakiense* と新種記載された。しかし現在 *G. mikimotoi*（尾田 1935）との異同が検討されている。

前述のように *G. nagasakiense* は漁業に大きな被害をもたらす有害な赤潮生物であるため，その赤潮の発生機構及びそれに対する対策のための調査・研究の必要性が早くから指摘されていた。*G. nagasakiense* に関するこれまでの研究報告を概説すると，以下のように整理できる。まず最も報告が多いのは現場調査に基づく赤潮発生と被害事例及び発生環境に関する報告であ

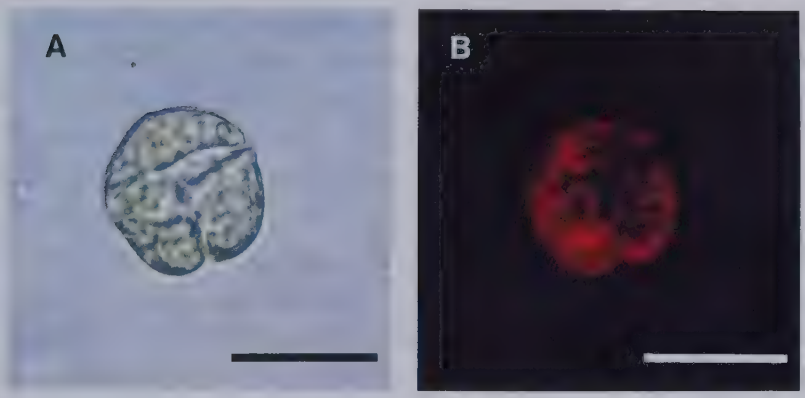


Fig.1-2. Light(A) and epifluorescence(B) micrographs of *G. nagasakiense*. Scale bars=30 μm.

る(飯塚・入江 1966, 入江・浜島 1966, 森・入江 1966, 塩川・入江 1966, 飯塚・入江 1969a, 飯塚・入江 1969b, 飯塚 1972, 田中他 1979, CHO 1981, 吉松他 1985, LEE and KWAK 1986, 竹内他 1986, 池田他 1987, 中田・飯塚 1987, 寺田 1987, 寺田他 1987, 松野他 1988, WONG 1989, HONJO *et al*. 1990, 保坂 1990, 板倉他 1990)。つぎに形態と分類に関するもので, 安達 (1972), 野呂他 (1981), 高山 (1981), TAKAYAMA and ADACHI (1984), TAYLOR (1985), 高山 (1986), SAKO *et al*. (1989), NAGASAKI *et al*. (1991) などの研究がある。さらに MATSUOKA *et al*. (1989) は本種の地理的分布についてまとめており, 毒性に関しては安部・平山 (1979) が, 海水の生物検定 (AGP) に関しては平山他 (1972) 及び平山・川端 (1982) が, また統計的手法による赤潮予察に関しては大内・高山 (1984) の研究がある。

赤潮の発生機構を解明して行く上で, 赤潮構成種の生理特性を明らかにすることは重要な課題の一つである。本種に関する生理学的研究は以下のようにまとめられる。HIRAYAMA and NUMAGUCHI (1972) は底泥抽出液が本種の増殖を促進することを認めた。沼口・平山 (1972) は増殖に好適な pH と塩分を調べ, ついで飯塚・中島(1975)によって本種が硫化物耐性を有することが示された。杉山他 (1979) は本種が優占する赤潮海水について光－光合成曲線を求めている。栄養生理に関しては, 魚類の肉ミンチやふん抽出液 (西村 1982), また微量金属であるセレン (ISHIMARU *et al*. 1989) が本種の増殖を促進するといった報告が見られる。また, HIRAYAMA *et al*. (1989) は本種のアルカリフォスファターゼ活性を認めている。しかし, 本種は *Chattonella* 属や *Heterosigma akashiwo* などに比べて培養が容易でないことなどから, 上記の研究のほとんどは有菌株によるものであり, 無菌株を用いた本種に関する系統的な生理学的研究は少なく, 解明されていない部分が多く残されているのが現状である。

赤潮の発生過程には多くの物理・化学的環境要素が複雑に関係している。したがって, その発生機構を解明するためには, 赤潮原因藻の生理とそれら環境因子との相互関係を定量的に把握することが必要である。特に生態系モデルを構築しシミュレーションによって赤潮予知を行

うような場合には，増殖速度と環境因子との定式化が不可欠である。しかし本種に関してはそのような定量的研究はこれまでなされていない。

赤潮による漁業被害を防止するため種々の対策が試みられてきた（岡市 1980，村上 1980，代田 1980）。しかし，赤潮発生後の対策として実用化されているものは皆無に等しい。そのため，赤潮の発生を事前に予知することによって被害の軽減と防止を図る必要がある（吉田 1980，安楽 1985a，1985b）。ところで，個体群動態論的観点からすると，赤潮現象はその構成種の増加要因が減少要因を上回った結果と解釈できる。それゆえ，増加要因を把握することは赤潮の発生機構の解明のみならず，それを予知して行く上でも重要である。自然条件下における個体群の増殖速度は種々の環境要因の影響を総合的に反映した結果であり，その種の潜在的な増殖能力を示しているであろう。そこで，増殖速度を指標とした赤潮予知の可能性が考えられる。増殖速度が赤潮の予知指標となり得るという根拠としては，赤潮発生の10日前から *G. nagasakiense* が1.0 division day^{-1}の高い増殖速度を有していたという大村湾での観測結果（飯塚 1987）が挙げられる。この値は室内で得られた本種の最大増殖速度（飯塚・峯 1983）に相当するものである。このように現場個体群における増殖速度の把握は赤潮予知技術の開発のために有望であり，その簡便な測定法の確立が早急に望まれる。

以上述べてきた背景から，本研究では *G. nagasakiense* 赤潮の発生機構の解明と赤潮予知のための生物学的情報の強化を図ることを主な目的とした。本論文は全７章から構成されている。本章の序論に続いて，第Ⅱ章では *G. nagasakiense* の分類学的な問題点と研究史を総括し，形態分類を補強するための分類基準として染色体数の有効性を検討した。第Ⅲ章においては，周防灘及び浦ノ内湾における現場調査に基づき，大規模赤潮発生年の海況条件の特徴及び栄養細胞の年間の出現状況と環境条件との関係を調べた。第Ⅳ章では培養実験によって水温，塩分，光強度及び栄養塩に対する本種の増殖生理を明らかにすると共に，比較のため *C. antiqua*, *C. marina* 及び代表的な珪藻類４種の増殖生理を明らかにした。第Ⅴ章では生物学的な赤潮の予知指標として細胞分裂指数による新しい増殖速度測定法の開発を行い，現場個体群への応用を検討した。第Ⅵ章では増殖速度測定法の基礎となる細胞周期を明らかにし，それに及ぼす環境要因の影響を調べた。第Ⅶ章では以上の成果を総括し，生物学的諸特性から見た *G. nagasakiense* 赤潮の発生機構について論じた。

第Ⅱ章　染色体数による *Gymnodinium nagasakiense* の分類学的検討

赤潮を形成する微細藻類は一般に単細胞性で形態的にも単純であるため，分類の基準となるような特徴に乏しい。さらに固定が困難な場合や，それが可能であっても固定に伴う形態変化が著しいなど，形態に基づく分類基準には不確定な要素が多い。

赤潮を構成する生物群のうち発生件数及び漁業被害の多いものは主として渦鞭毛藻とラフィド藻である。これら両生物群に属する生物種については分類学的検討が繰り返され，属名及び

種名の改変等が盛んに行われてきており，様々な混乱の原因となっている（TAYLOR 1985）。本研究の対象種である *Gymnodinium nagasakiense* もその例外ではなく，分類学的な問題は解消していない。そこで本論に入る前に，*G. nagasakiense* に関する分類学的研究の総括を行うとともに，その問題点を整理する。なお本章では随所に *Gyrodinium* 属の記述を行う必要があり，*Gymnodinium* 属との混乱を避けるために属名の省略形にはそれぞれ *G.*（＝*Gymnodinium*）及び *Gyr.*（＝*Gyrodinium*）を用いる。

ギムノディニウム目（Gymnodiniales）に属する渦鞭毛藻は殻板や鎧板を欠くため無殻類と呼ばれる。科（Gymnodiniaceae）の分類はほとんど外部形態に基づいており，内部構造に基づく基準はワルノヴィア科（Warnowiaceae）におけるレンズ眼（Ocellus）やアクチニスクス科（Actiniscaceae）における骨片など特殊なものに限られている。属（*Gymnodinium*）の分類基準としては横溝（cingulum）の特徴が最も重要であり，その発達の程度（細胞を何周するか），存在部位，そして溝の始端と末端の段差（displacement）などによって分類されている（福代 1987a）。しかし細胞自体が弱いため長時間にわたる詳細な観察や固定は困難であり，このことが形態分類の不確実性の原因の一つとなっている。

G. nagasakiense についても他の赤潮生物同様その種名が何度か改変され，現在も種名に関する論議が行われている。ここで本種の種名の変遷をたどってみたい。1965年の夏季に大村湾で発生した赤潮に関する研究報告の中で，本種は「*Gymnodinium* のある種，*G. ochracaeum* の記述に大体一致するが三重大学安達六郎氏によって別種と認定された」と記述された（飯塚・入江 1966）。その後，飯塚・入江（1969a）によって *Gymnodinium* sp.（65年型種）と仮称されるようになった。一方，安達（1972）は写真資料に基づき，1957年11月の山口県徳山湾（前川 1961）及び1965年の大村湾における赤潮形成種を *Gymnodinium* sp. 1 と呼んだ。また1975年には *G. nagasaki* と記述した報告も見られた（飯塚・中島 1975）。高山（1981）は，走査電子顕微鏡を用いて *Gymnodinium* sp.（'65年型種）の詳細な形態観察を行い，上錐体における縦溝や上錐溝（apical groove）の形態が本種の重要な標徴であることを初めて明らかにした。その後1984年になってようやく *G. nagasakiense* として新種記載が行われ（TAKAYAMA and ADACHI 1984），現在に至っている。

現在 *G. nagasakiense* との異同が論議されている種に *G. mikimotoi* がある。本種は尾田（1935）によって1934年冬に五ヶ所湾で発生した赤潮の原因藻としてその形態が記載されるとともに，三宅・小南によって新種記載の予定であるとされた。しかし，その後も両氏による記載はなされなかった。TAKAYAMA and ADACHI（1984）は *G. mikimotoi* は形態が五角形をしていること，燐光を放つという点で *G. nagasakiense* とは異なり，別種であるとした。ところが TAYLOR（1985）は細胞の大きさが同じであること，背腹に偏平であること，分散する葉緑体を有すること，横溝の段差が同じであること，核の形態と位置が同じであることなどから，TAKAYAMA and ADACHI（1984）による別種説に異論を唱えた。さらに MATSUOKA *et al.*（1989）も *G. nagasakiense* にはかなり形態変異があること，そして冬季でも赤潮を形成するといった生態的特徴等から，*G. nagasakiense* は *G. mikimotoi* MIYAKE et KOMINAMI ex

ODA（尾田 1935, 高野 1971）と同種である可能性を指摘している。

G. nagasakiense と形態的に類似する渦鞭毛藻に *Gyr. aureolum* がある。本種は北ヨーロッパや北米沿岸域にかけて，また南半球でもブラジル沿岸域で赤潮を引き起こし，漁業被害を及ぼしている（PARTENSKY and SOURNIA 1986, MAHONEY *et al.* 1990）。本種は HULBURT（1957）によって米国マサチューセッツで初めて記載された種である。その後 *G. nagasakiense* と時を同じくするかのように1966年にノルウェー沿岸域で大規模な赤潮を形成した（BRAARUD and HEIMDAL 1970）。TANGEN（1977）は *Gyr. aureolum* の形態は HULBURT（1957）の原記載と一致するものの形態変異がかなり大きいこと，さらに本種が *G. nagasakiense* と形態的に酷似すると報告した。それに対して TAKAYAMA and ADACHI（1984）は *Gyr. aureolum* の核の形態と位置が *G. nagasakiense* とは異なることから，これら2種は別種であるとした。しかし TAYLOR（1985）は *G. mikimotoi* と *Gyr. aureolum* 及び *G. nagasakiense* が形態的には区別できないと述べている。一方，PARTENSKY and SOURNIA（1986）は，ヨーロッパに出現する *Gyr. aureolum* の分類が複雑で混乱しているとして *Gyr.* cf. *aureolum* と呼ぶことを提案した。その後彼らは本種が *Gyr. aureolum* の原記載（HULBURT 1957）よりも日本の *G. nagasakiense* に酷似すること，さらに *Gyr. aureolum* という種名が異なるいくつかの種に当てられている可能性を指摘し，近い将来これらの分類学的検討が行われることを前提に *Gyr.* cf. *aureolum* の代わりに *G.* cf. *nagasakiense* と呼ぶことを提唱している（PARTENSKY *et al.* 1988）。ただし *G. nagasakiense* が *G.* cf. *nagasakiense* よりも核DNAを40%多く有すること，さらに後者には"大型細胞"と"小型細胞"の2つの形態が存在することから，PARTENSKY *et al.*（1988）は *G. nagasakiense* と *G.* cf. *nagasakiense* が同一種であるとの見方に疑問を呈している。

Gyr. aureolum では，全カロチノイドのうち71%が19'-hexanoyloxyfucoxanthin で占められるといった色素組成の特徴がある（TANGEN and BJÖRNLAND 1981）。この特殊なカロチノイドは *G. nagasakiense* にも存在するとされている（PARTENSKY *et al.* 1988）。しかし鈴木・石丸（1988）は *G. nagasakiense* の和歌山株及び周防灘株における fucoxanthin は 19'-hexanoyloxyfucoxanthin と異なっており，さらに fucoxanthin，diatoxanthin，diadinoxanthin の存在割合が同程度であることから，これら2種は近縁とは言えずかけ離れた種であると指摘している。さらに最新の研究によれば，*G. nagasakiense* の共通抗原を認識するモノクローナル抗体がヨーロッパの *G.* cf. *nagasakiense* とは反応しないことが明らかにされた（NAGASAKI *et al.* 1991）。以上の結果を総合すると現状では *G. nagasakiense* と *G.* cf. *nagasakiense* とは異なる種と考えた方が良さそうである。

これまで述べてきたように，*G. nagasakiense* とそれに類似する渦鞭毛藻の分類は複雑で混乱している。現時点では *G. nagasakiense* と *G. mikimotoi* は同種である可能性が高いが，それらとヨーロッパの *G.* cf. *nagasakiense* は別の種であるようである。*G. nagasakiense* と *G. mikimotoi* との問題を解決するためには，*G. mikimotoi* のタイプ産地である五ヶ所湾における両種の精査が必要となろう。また *G. mikimotoi* の場合とは異なり，*G. nagasakiense* と *G.* cf.

nagasakiense にはいくつかの培養株も保存されている。したがって，以上のような *G. nagasakiense* をめぐる分類学的な混乱を解決するためには，形態的な指標のみならず，細胞学的，生化学的，遺伝学的あるいは生態的な特性をも調べることが必要である（DODGE 1963a, SHYAM and SARMA 1978, SAKO *et al.* 1989）。細胞学的な分類基準の一つに染色体数が挙げられる（DODGE 1963a）。現生の渦鞭毛藻には約4,000種が知られているが，その中で染色体数が明らかにされているのはわずかに50種程度である（SPECTOR 1984）。その原因には渦鞭毛藻の染色体数が極めて多いこと，さらに計数方法が確立されていない点が挙げられよう（SIGEE 1986）。そこで本章では，*G. nagasakiense* の染色体計数法を確立し，それによって染色体数の計数を行い，分類基準としての有効性を検討した。

材料及び方法

1. 供試株と培養条件

染色体計数に用いた *G. nagasakiense* は，Fig. 2-1に示す周防灘（分離年月：1985年7月），広島湾（同：1988年8月），高知県浦ノ内湾（同：1989年7月）及び三重県五ヶ所湾（1989年8月）から分離したクローン株である。なおこれらの分離株のうち浦ノ内湾株及び五ヶ所湾株についてはそれぞれ高知県水産試験場及び南勢町種苗生産施設より南西海区水産研究所に送付された海水中から分離しクローン化したものである。また広島湾株は南西海区水産研究所赤潮環境部の板倉 茂技官から分譲されたものである。これらの株の培養は培地に改変SWM-3培地（CHEN *et al.* 1969，伊藤・今井 1987）を用い，温度は22℃，光強度は120 μE $m^{-2}s^{-1}$，明暗周期は14hL:10hDの条件で行った。

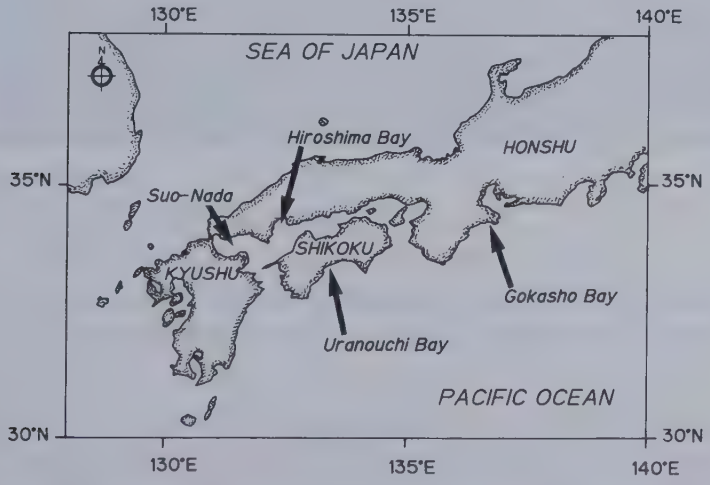


Fig.2-1. Locations of sampling site of *G. nagasakiense* for chromosome counting.

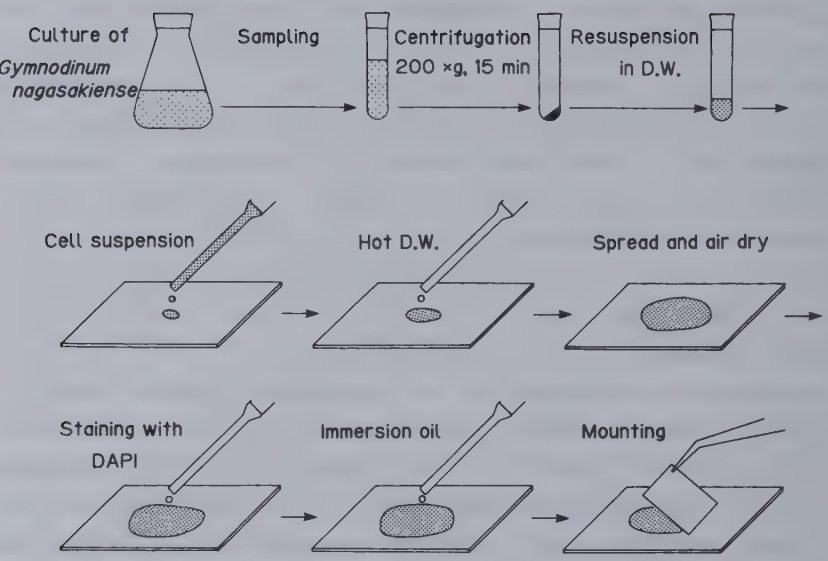


Fig.2-2. Illustration of chromosome spreading technique for *G. nagasakiense*.

2.染色体計数標本の作成

計数用標本の作成手順をFig. 2-2に示す。対数増殖期にある *G. nagasakiense* の培養から培養液5 m*l*を採取し，10 m*l*の丸底遠心管に入れ室温で遠心分離（200×g，15分）後，上澄みを捨てた。次に細胞質を膨潤させて展開し易くするため，次のような低張処理を行った。すなわち，細胞ペレットに蒸留水1 m*l*を加え，その状態で15分程度室温に放置した。処理後の細胞懸濁液の数滴を，あらかじめ50℃に熱したホットプレート上に並べた無蛍光スライドグラス上に滴下し，さらにその上から50℃に温めた蒸留水数滴を加えて展開した。水分が蒸発した時点でスライドガラスをホットプレートから取り上げて冷却した。それにTris緩衝液（HAMADA and FUJITA 1983）に溶解した蛍光染料4',6-diamidino 2-phenylindole（DAPI）溶液（0.5 μg ml^{-1}）を滴下して染色し，その上から無蛍光エマルジョンオイルを1滴落としてカバーグラスで封入した。染色体標本の観察は落射蛍光顕微鏡（UV励起）によって行い，染色体が良く展開した標本について写真を撮影し，撮影像に基づいて染色体数の計数を行った。

結果及び考察

上述の方法で観察された *G. nagasakiense* 周防灘株の細胞核及び染色体の蛍光顕微鏡写真をFig. 2-3A, Bに示す。*G. nagasakiense* の核は若干展開しているためやや大きく，長さ約

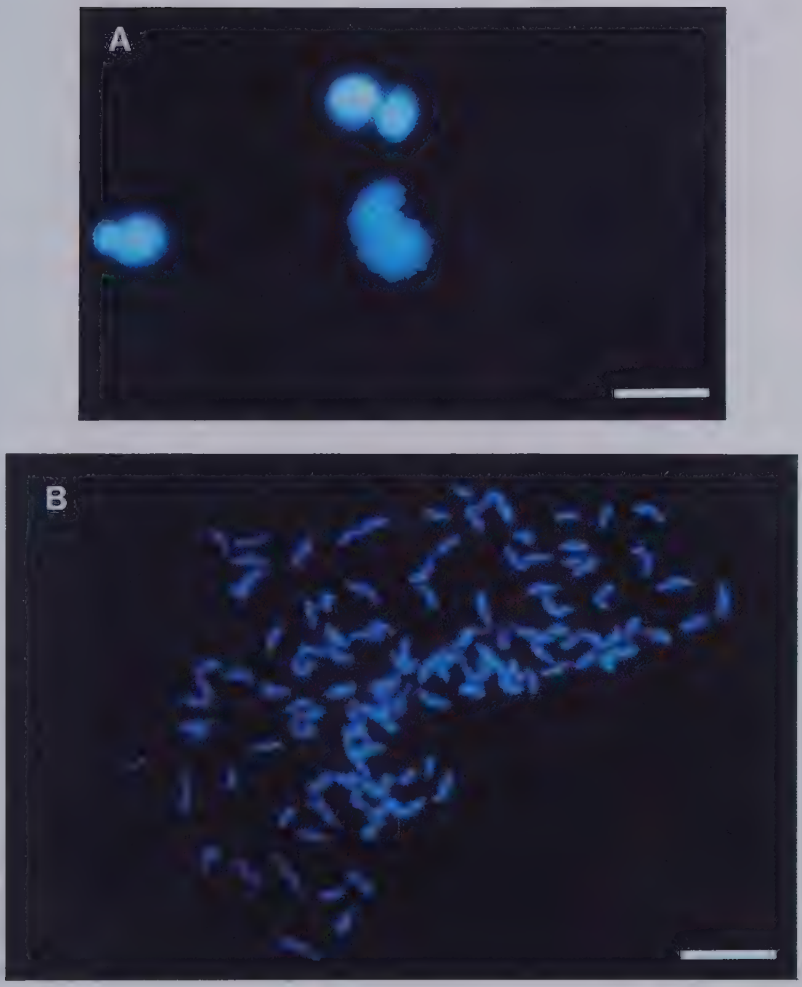


Fig.2-3. Epifluorescence micrographs of *G. nagasakiense* nucleus (A) and chromosomes (B). The nucleus and chromosomes were stained with DAPI. Scale bars=30μm

30 μm，幅20 μmの腎臓型を呈し，内部に粒状あるいはヒモ状に凝集した染色体が複雑に絡みあっている様子が観察された（Fig. 2-3A）。これは渦鞭毛藻に典型的な核の特徴とされている（TANGEN and BJÖRNLAND 1981）。一方，染色体は長さ10～20 μm，幅1.5～2 μmの紐状あるいは螺旋状の形態を示した（Fig. 2 3B）。DODGE (1963b) によれば，渦鞭毛藻の染色体の大きさにはかなり変動幅がある。大型のものでは *Prorocentrum* の染色体は長さ10～15 μm，径1 μmの棒状であり，また小型のものでは *Massartia rotundata* の径0.5 μmの球形があるとされている。SHYAM and SARMA (1978) も淡水産の渦鞭毛藻の染色体の長さが0.75～10 μmの範囲にわ

Table 2-1. Chromosome counts of various strains of *G. nagasakiense*.

Strain	n	Mean	SD
Gokasho Bay	18	114	5.0
Hiroshima Bay	12	114	5.0
Suo Nada (G303)	35	111	4.0
Uranouchi Inlet	40	113	4.0
Pooled	105	113	5.0

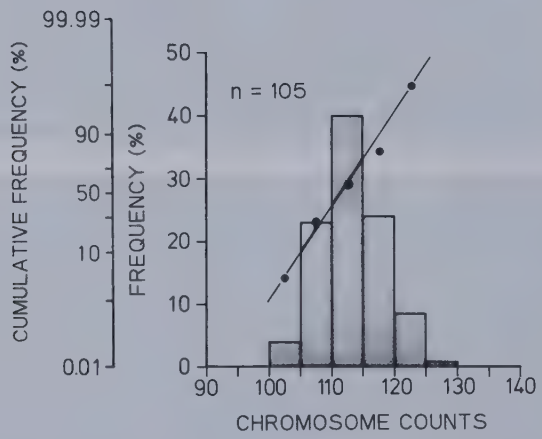


Fig.2-4. Frequency distribution and normal probability plots of cumulative frequency of chromosome counts of *G. nagasakiense*.

たると報告している。これらと比較すると，本種の染色体はかなり大型であると言える。また個々の染色体の形態及び大きさにはあまり変化が見られないことから，染色体の形態に基づく核型分析はかなり困難であると考えられる。渦鞭毛藻の染色体は動原体を欠くため（Dodge 1963b, Shyam and Sarma 1978）一次狭窄も見られず，このような単純な形態を示すのであろう。

他の標本ではFig. 2-3Bに示したものより細長い形態の染色体が観察された。他の渦鞭毛藻 *Gyr. cohnii*（＝*Crypthecodinium cohnii*）や *Gyr. aureolum* では，分裂の初期には静止期に比べて染色体がより細長くなると報告されている（Kubai and Ris 1969, Tangen and Björnland 1981）。したがって，本種の場合もこのような長い染色体の出現は分裂に伴う変化であると考えられる。

異なる4海域から得られた *G. nagasakiense* クローン株の染色体計数結果をTable 2-1にまとめた。本種の染色体数は平均111～113であり，周防灘株でやや少ない傾向が見られた。また標準偏差は4～5であった。このような計数値のばらつきの要因としては，染色体同士の重なり合いやガラス面からの脱落及び計数誤差といった方法上の問題と，細胞分裂時の染色分体の

不分離や断片化（SHYAM and SARMA 1978）といった生物的な要因が考えられる。

計数値の分布特性を調べるため，全計数値に基づいた頻度分布及び累積度数の正規確率紙上へのプロットをFig. 2-4に示す。染色体計数値の頻度分布は一つのモードを有し，左右に対称な分布パターンを示した。また累積度数のプロットも明らかに1本の直線に乗ることから，得られた計数値は同一の正規母集団から得られたものと見なすことができる。さらに分散分析によって平均値の差を検定した結果（Table 2-2），各水準における平均値は等しいとした帰無仮説は5％有意水準で棄却されなかった（F-検定，df＝3,101，$p>0.05$）。以上の統計検定結果は *G. nagasakiense* の染色体数に株間による差がないことを示している。したがって全計数値に基づき，*G. nagasakiense* の染色体数は113±5（n＝105）と結論できる。

Peridinium 属や *Ptychodiscus brevis*（＝*G. breve*）では培養年数に伴い染色体数が増加する現象（倍数化：polyploidy）が報告されている（LOPER *et al.* 1980, HOLT and PFIESTER 1982）。しかし *G. nagasakiense* の場合，最も培養年数が長い周防灘株で分離後5年を経過しているが，このような染色体数の増加は見られなかった。渦鞭毛藻の種分化機構の一つに倍数化を挙げている報告もあることから（LOEBLICH *et al.* 1981），本種の倍数化の存在についてはさらに検討する必要があろう。

SPECTOR（1984）は渦鞭毛藻の染色体計数値を取りまとめている。その結果によれば，渦鞭毛藻の染色体数は最小4（*Syndinium borgerti*）から325（*Endodinium chattoni*）と非常に広い範囲にわたっている。しかしながら大多数の渦鞭毛藻の染色体数は150以内である。その中で *G. nagasakiense* の113という値は比較的数が多い部類に入る。*G. nagasakiense* と形態的に類似している *P. brevis* では121±3（LOPER *et al.* 1980），*G.* cf. *nagasakiense* では117±3（PARTENSKY *et al.* 1988）という値が報告されている。これらの値と *G. nagasakiense* で得られた結果との差を検討するため，平均値の差の検定を行った。その結果，*G. nagasakiense* と *G.* cf. *nagasakiense* との間には有意な差は認められなかったが（t-検定，df=106，$p>0.05$），*P. brevis* との間には有意な差が見られた（t 検定，df-128，$p<0.01$）。すなわち *G. nagasakiense* の染色体数は *P. brevis* のそれとは明らかに異なるが，ヨーロッパの *G.* cf. *nagasakiense* の染色体数と差があると言えないことになる。したがって，もしこの2種（*G. nagasakiense* と *G.* cf. *nagasakiense*）が別種であるならば，これらは共通の祖先を有し，地理的な隔離によって別々の種へと分化したことが推測される。

Table 2-2. Analysis of variance table of difference in chromosome counts of *G. nagasakiense*.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Mean square	F
Strain	3	126.5	42.2	1.96 ns
Error	101	2173.0	21.5	
Total	104	2299.5		

以上のように *G. nagasakiense* の染色体数には海域差が見られず，また培養年月が経過しても安定であることから，形態分類を補強するための客観的な分類基準として有効であると考えられる。

第Ⅲ章　現場海域における *Gymnodinium nagasakiense* の出現特性

赤潮発生機構を解明するための最も基本的なアプローチは，海況・気象条件等の環境因子の変動と赤潮発生との因果関係を明らかにすることである。このためには赤潮発生期に現場調査を行い，物理・化学的環境要因と赤潮生物の動態を把握することが重要である。ところで，これまでの現場調査は赤潮発生時の環境特性を明らかにすることに重点が置かれていたため，赤潮発生の盛期である夏季に集中する傾向があった。そのため年間を通じた調査はほとんど行われておらず，夏季以外における赤潮生物の生態については不明の点が多く残されている。しかし，赤潮のシードポピュレーションとしてシスト等の休眠細胞の重要性が指摘されるに至り（Wall 1971, 1975, Sako *et al*. 1984, Imai and Itoh 1987），赤潮発生期以外の赤潮生物の生態を明らかにすることの重要性が認識されるようになった。

以上のような観点から，本節では現場海域における *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮の発生と環境因子との関係及び本種の年間の生活様式を明らかにするため，現場調査を行った結果について述べる。まず第1節では，瀬戸内海西部に位置する周防灘の夏季調査に基づき本種の赤潮発生と環境因子との関係を調べ，大規模赤潮に至る海況的特徴を抽出した。第2節では，高知県浦ノ内湾において一年間にわたり高頻度の調査を行い，*G. nagasakiense* 栄養細胞の出現と環境因子及び珪藻類の出現との関係について述べた。

第1節　夏季の周防灘における赤潮発生と環境要因

周防灘は瀬戸内海西部に位置し，総面積は3,100 km^2，平均深度は23.7mで，内海では伊予灘，播磨灘に次いで第3位の規模をもつ灘である（村上 1976）。周防灘は東部は伊予灘を経て豊後水道に，また西部は関門海峡を経て響灘に通じている。

周防灘ではこれまで *G. nagasakiense* とラフィド藻である *Chattonella* spp. による赤潮が発生し，漁業に被害が及んでいる。このうち *Chattonella* 赤潮についてはその生活史が明らかにされ（Imai and Itoh 1987），発生機構に関する検討がなされている（今井他 1986）。しかし，*G. nagasakiense* の生態に関しては不明の点が多く，その発生機構も解明されていない。

周防灘における *G. nagasakiense* 赤潮は灘北東部に位置する徳山湾で1957年にすでにその発生が報告されている（前川 1961）。それ以降，1962, 1964, 1965, 1967～69, 1971, 1976～80, 1982及び1984年にその赤潮発生が記録されている（池田他 1983，水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 1985）。このように周防灘では *G. nagasakiense* 赤潮が頻度高く発生していることから，初

夏から盛夏にかけて現場水域での栄養細胞の分布並びに出現状態を調べ，それらと環境因子との関係を把握することは，赤潮の発生機構を知る上で重要な手がかりとなろう。

以上の背景から，本節では周防灘全域を対象水域に設定し，1985年から1987年の夏季にかけて調査を行った結果について述べる。この3年間の調査を通して *G. nagasakiense* の大規模赤潮年から赤潮非発生年にわたる極めて特徴的な年変化を観測することができた。そこで，それらの年の環境条件の差異を比較することによって大規模赤潮発生条件の抽出を試みた。

調査方法

1. 全域調査

現場調査は1985年から1987年の3年間にわたり，6月下旬，7月中旬，8月上旬及び8月下旬（1987年調査では行わず）の計4回周防灘に設けた29定点（Fig. 3-1）で，南西海区水産研究所調査船「しらふじ丸」によって実施した。各定点の0m，5m及び10mあるいは海底上1m（B-1m）層よりバンドーン採水器で採水し，生海水，あるいは10 μmプランクトンネットで50倍に濃縮した試水を採水日当日に船上にて検鏡を済ませ，*G. nagasakiense* の細胞数を計数した。水温と塩分は鶴見精機製STD，溶存酸素はDOメーター（YSI Model 58）を用いて，0，2，5，10m層，そして10m以深では10m間隔でB-1m層まで測定した。

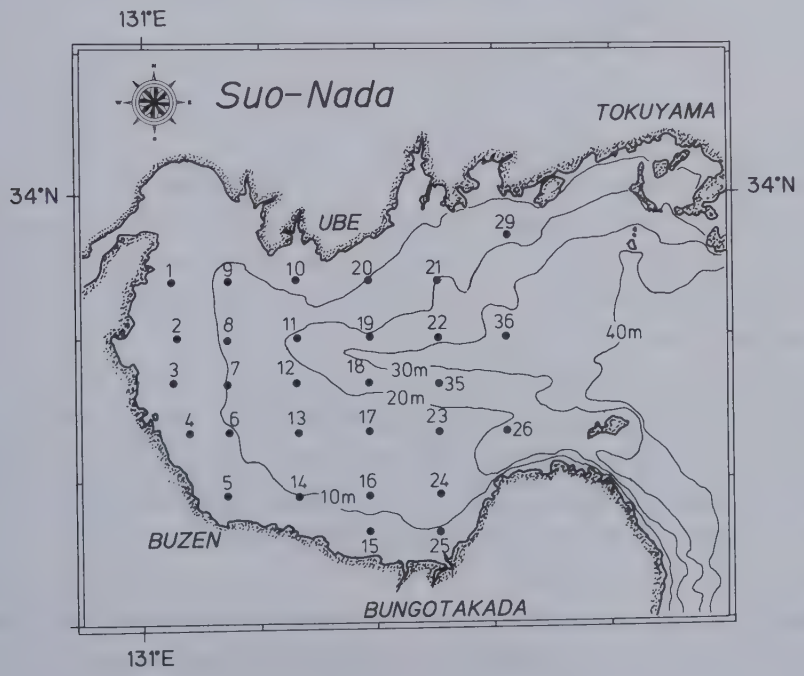


Fig.3-1. Location of the sampling stations in Suo Nada, western Seto Inland Sea.

2.昼夜連続観測

G. nagasakiense の鉛直移動を調べるため，1985年７月17～18日に福岡県豊前市宇島港において24時間の連続観測を実施した。17日の09:00より１～４時間ごとに定点（水深８m）の０，３，６及びB-1m層より採水を行い，検鏡によって *G. nagasakiense* の細胞数を計数した。

結果及び考察

1.1985年全域調査

（1）*G. nagasakiense* の分布

各調査時の各層（０，５，10 mあるいはB 1m層）における *G. nagasakiense* 細胞密度の水平分布をFig. 3-2に示す。６月下旬には栄養細胞は灘の東半分に分布し，高密度域（>5 cells ml^{-1}）は各層とも東部の灘入口付近に見られた。７月中旬になると細胞密度の増大及び分布範囲の拡大が顕著であった。すなわち，灘全域にわたって細胞密度は10^2 cells ml^{-1}以上となり，特に灘中央部と南西部では10^3 cells ml^{-1}を越える高い細胞密度に達し，灘全域にわたる大規模赤潮の様相を呈した。８月上旬になると細胞密度は著しく低下し，灘中央部と西部沿岸域で0.5 cells ml^{-1}以下の分布が見られたに過ぎなかった。したがって，この時点で赤潮は消滅状態にあったと言える。８月下旬になると，灘中央部及び東部の一部で再び1 cell ml^{-1}を越える海域が見られた。以上のように1985年は灘全域に及ぶ赤潮が発生し，大規模発生年であったと言える。

（2）水温，塩分及び溶存酸素

表層（０m層）における水温，塩分及び底層（B-1m）における溶存酸素飽和度の水平分布をFig. 3-3に，また東西方向（St.3,7,12,18,35）と南北方向（St.15,16,17,18,19,20）における水温と塩分の鉛直断面をFig. 3-4及びFig. 3-5にそれぞれ示す。

６月下旬の表面水温は21～23℃にあり，灘南部で高かった。７月中旬になるとかなり上昇し22～27℃となった。高水温域は灘中央部から南西部にかけて見られ，前述の *G. nagasakiense* の高密度分布域とほぼ一致していた。８月上旬に入ると灘全体で28～30℃となり，中央部で低く，南西部沿岸域で高い傾向を示した。８月下旬になると，灘南部と東部で比較的低い（<27℃）海域が見られ始めた（Fig. 3-3）。

水温の鉛直分布によれば，6月下旬の水温は底層で16℃，表層で21℃であり，10 m付近に弱い水温躍層が見られた。７月中旬には底層で17℃，表層で26℃となり，躍層は浅く５～10 m層に存在した。また，灘北部では表面付近まで底層水の上昇が見られた。８月上旬になると水温は底層で20℃，表層で29℃と全体的に上昇し，著しい水温躍層が10 m付近に見られた。８月下旬になるとさらに水温の上昇が進み，27℃の等温線が15 m深付近にまで達した。しかし躍層は弱まる兆しがうかがえた（Fig. 3-4）。

表面塩分の水平分布によれば(Fig. 3-3)，６月下旬には灘西部を除く広い範囲で塩分は30‰以下であった。７月上旬になると低塩分化がさらに進み，灘全域で30‰以下，中央部から南部では27‰以下に達した。８月上旬になると塩分は回復し，灘全域で30‰台となった。さらに８月下旬になると31～32‰にまで回復した。塩分の鉛直分布によれば６月下旬には灘南部表層で

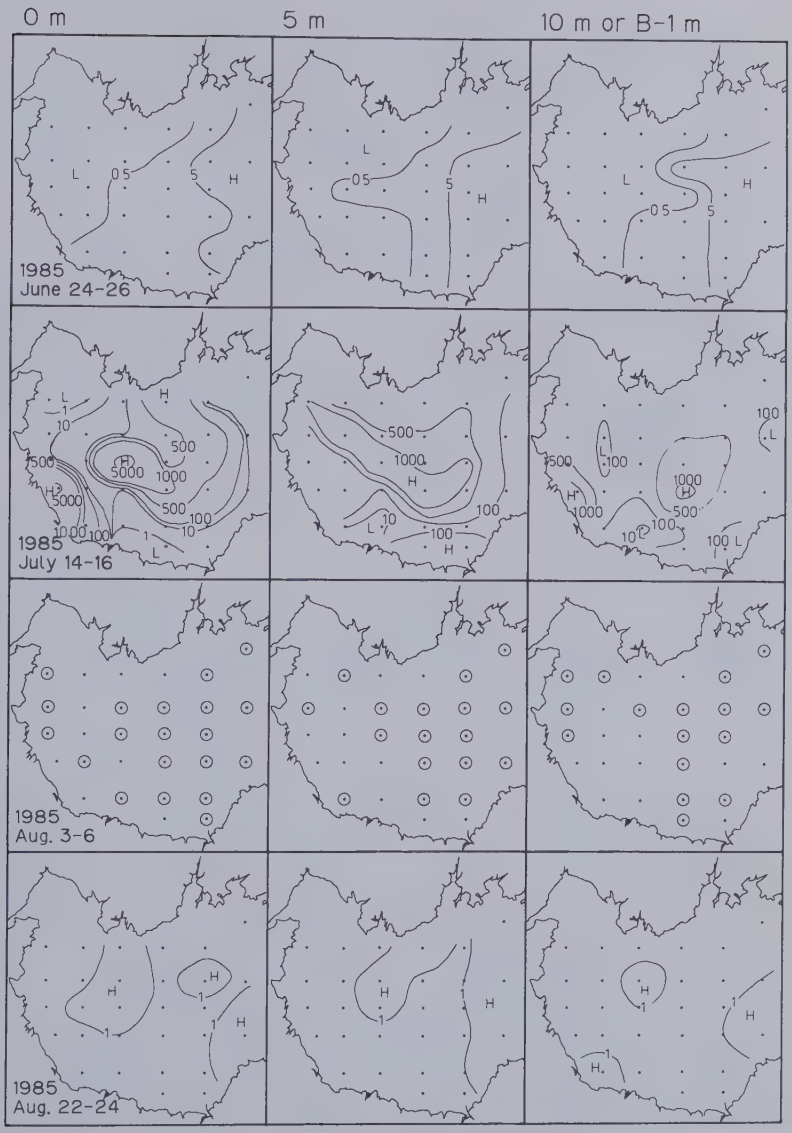


Fig.3-2. Horizontal distributions of vegetative cells of *G. nagasakiense* at 0 m, 5 m, and 10 m or B-1m depth during the summer in 1985. Numerals show the cell number (cells ml^{-1}). Circled dots in Aug. 3–6 indicate the station where vegetative cells were detected (less than 0.5 cells ml^{-1}).

若干低下していたものの，ほぼ30～33‰であった。しかし，7月中旬になると著しい塩分低下が見られた。すなわち，表面から10 m層にかけて30‰以下となり，10 m付近に強固な密度躍層が形成されていた。8月以降になると塩分の回復によって明瞭な鉛直分布パターンは見られなくなった（Fig. 3-5）。

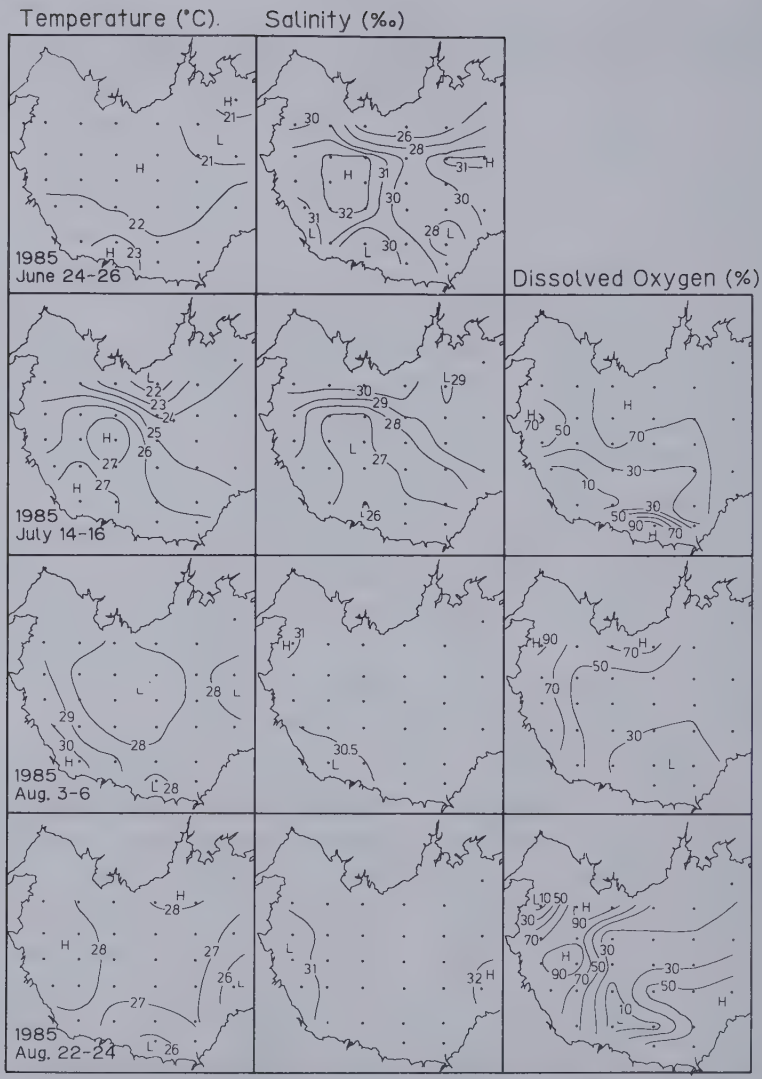


Fig.3-3. Temperature and salinity at the surface and dissolved oxygen at the bottom during the summer in 1985.

底層における溶存酸素飽和度を見ると（Fig. 3 3），7月中旬には灘南西部に30%以下の海域が見られ，沿岸部では10%以下と著しく低下していた。特に飽和度の低い定点では採水時に硫化水素臭が認められた。8月上旬には中部から東部にかけて50%以下の海域が広がっており，南部では30%を下回っていた。この傾向は8月下旬にも見られ，灘南部から東部にかけて飽和度は30%以下であった。

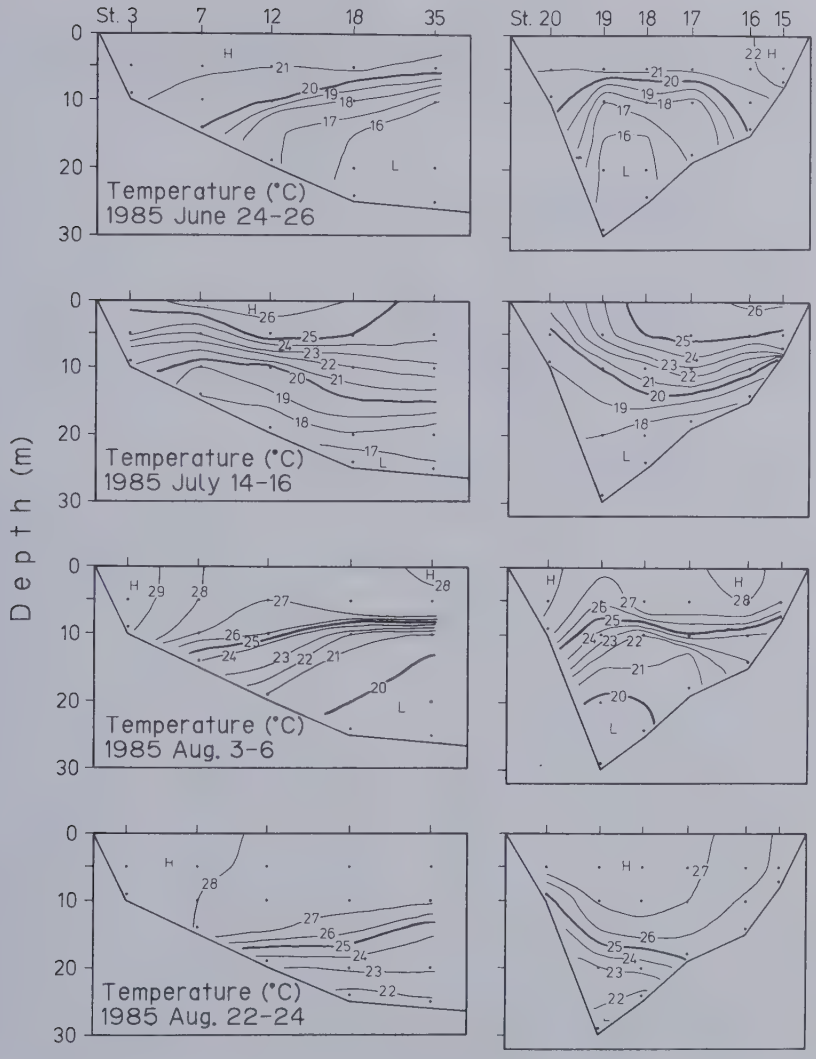


Fig.3-4. Vertical distributions of temperature along the east to the west (left panel) and the south to the north (right panel) transections during the summer in 1985.

2. 1986年全域調査

(1) *G. nagasakiense* の分布

G. nagasakiense 細胞密度の水平分布を Fig. 3-6に示す。6月下旬には灘北東部及び南部に1 cell m*l*⁻¹以上の密度で分布し，表層での分布範囲が最も広かった。7月中旬になるとほとんどの定点に分布が拡大していた。特に5m層での分布密度が高く，西部から南部沿岸域及び東部

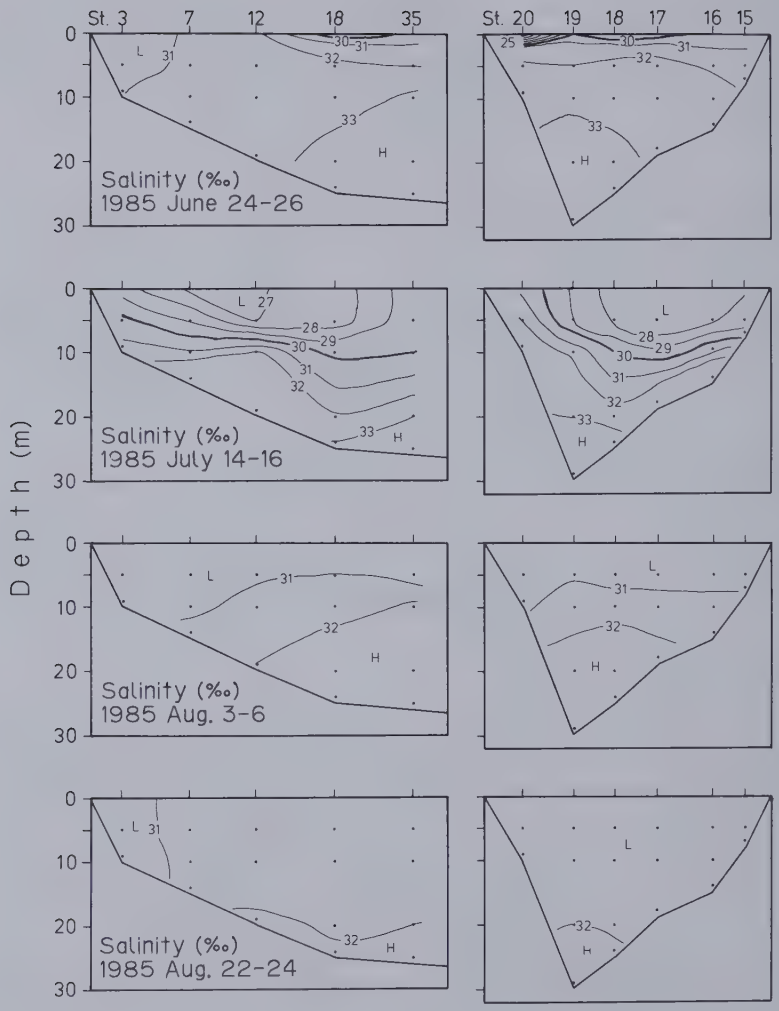


Fig.3-5. Vertical distributions of salinity along the east to the west (left panel) and the south to the north (right panel) transections during the summer in 1985.

で10 cells ml^{-1}を越え，局所的には10^2 cells ml^{-1}以上に達する所も見られた。8月上旬になるとさらに細胞密度が増大し，表層と5m層では灘南東部と北部で，また底層では中央部を除く全域で10^2 cells ml^{-1}を越えていた。さらに表層では国東半島の北部で10^3 cells ml^{-1}以上に達する細胞密度が見られた。このように1986年は細胞密度が高くなったのは8月上旬で，1985年に比べて2週間程度遅れていた。8月下旬になると細胞密度はかなり低下し，西部沿岸域に局所

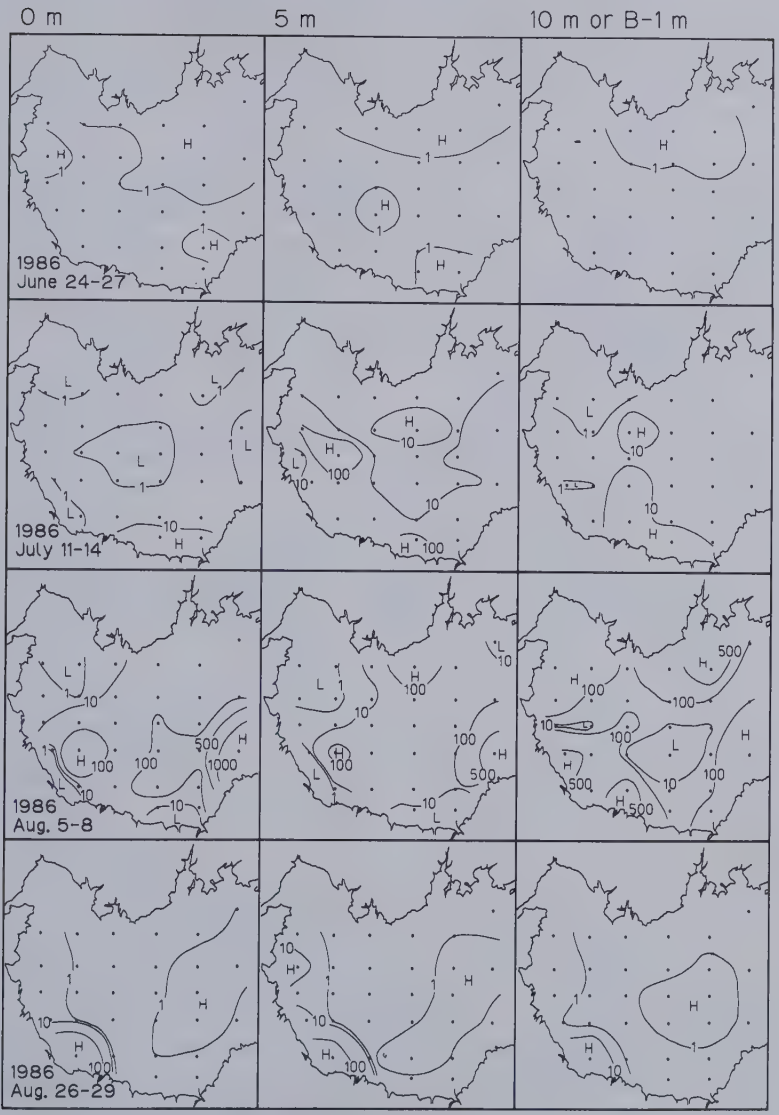


Fig.3-6. Horizontal distributions of vegetative cells of *G. nagasakiense* at 0 m, 5 m, and 10 m or B-1m depth during the summer in 1986. Numerals show the cell number (cells ml^{-1}).

的に10^2 cells ml^{-1}を越える分布が見られるのみとなった。以上のように，1986年は1985年ほど大規模な赤潮発生には至らなかったものの，中規模程度の赤潮発生年であったと言える。

（2）水温，塩分及び溶存酸素

水温，塩分及び溶存酸素の水平分布をFig．3-7に示す。6月下旬の表面水温は21～24℃で，

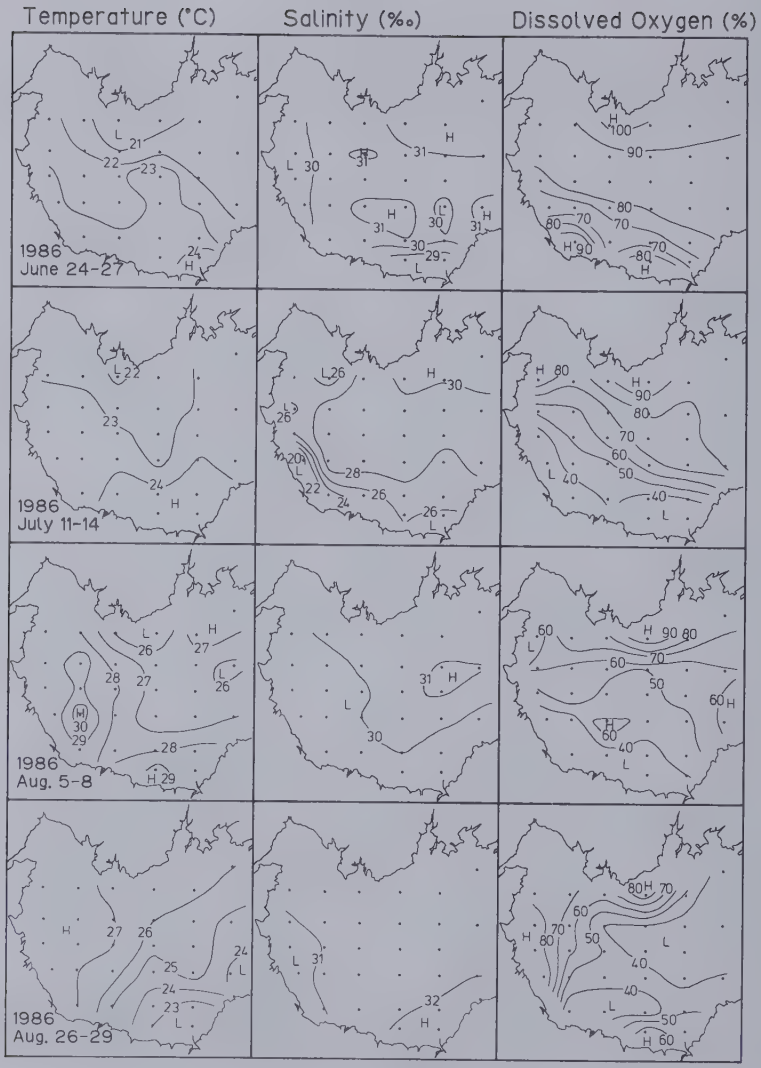


Fig.3-7. Temperature and salinity at the surface and dissolved oxygen at the bottom during the summer in 1986.

灘南部で高かった。7月中旬における水温もほぼ同範囲にあったが，南部でやや高い傾向が見られた。8月上旬になると水温はかなり上昇し26～30℃となった。高水温域は灘南部と西部沿岸域に分布していた。8月下旬に入ると水温は低下し，高水温域は灘西部のみに限られた。

東西方向及び南北方向における水温の鉛直断面をFig. 3-8に示す。6月下旬には16～23℃であり，10 m付近に弱い躍層が見られた。水温は灘西部及び南部に行くほど高い傾向がうかがえ

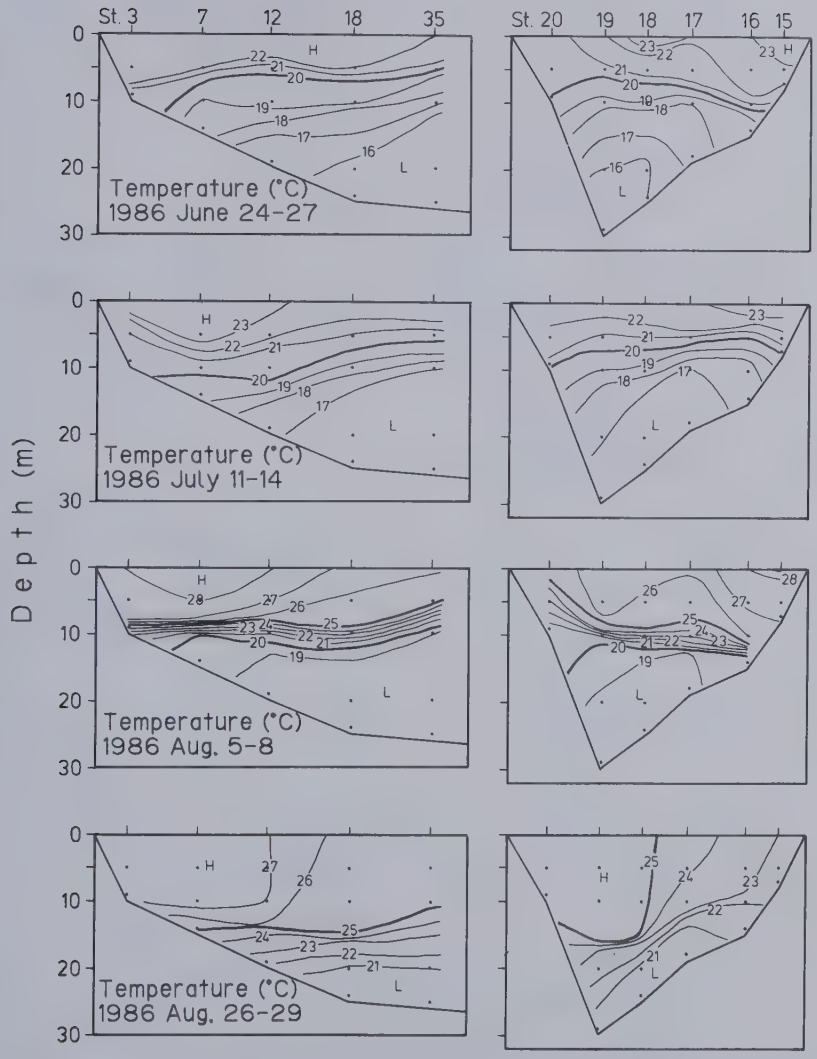


Fig.3-8. Vertical distributions of temperature along the east to the west (left panel) and the south to the north (right panel) transections during the summer in 1986.

た。7月上旬においても6月調査と同様の鉛直分布を示した。8月上旬になると10 m層に著しい水温躍層が発達し，その上下では10℃に及ぶ水温較差があった。8月下旬になると表層水の昇温がさらに進み，弱い躍層が15 m層付近に存在した。また灘南部に低温水の上昇が見られた。

表層塩分の水平分布によると（Fig. 3-7），6月下旬には灘西部及び南部の沿岸域で30 ‰以

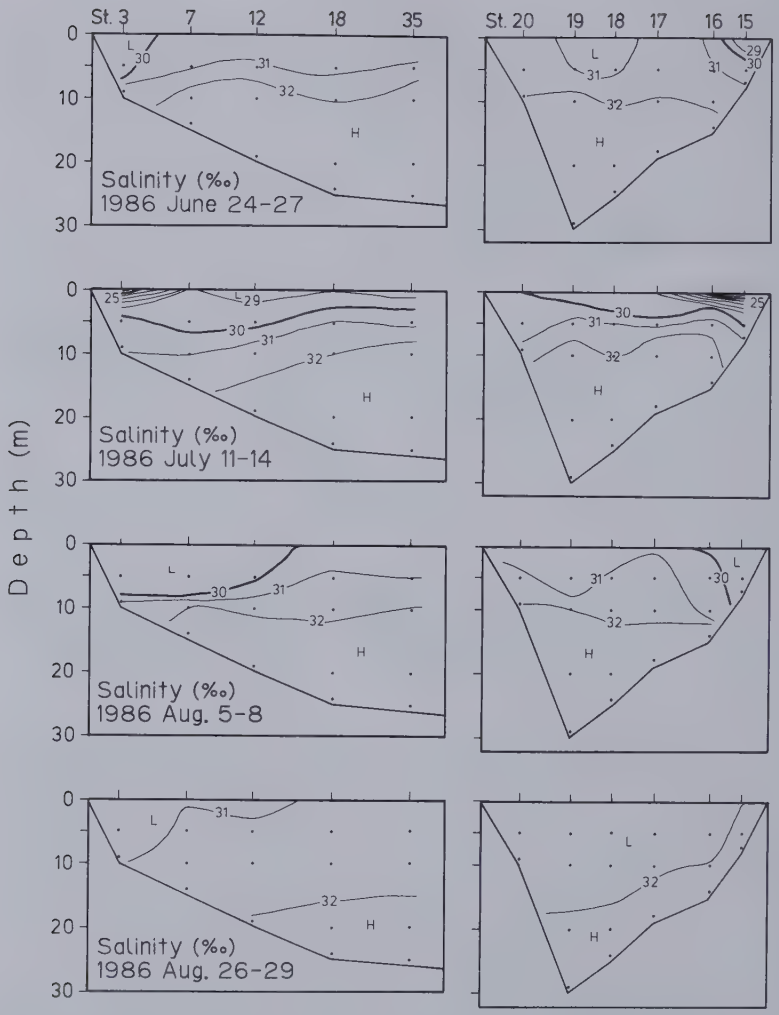


Fig.3-9. Vertical distributions of salinity along the east to the west (left panel) and the south to the north (right panel) transections during the summer in 1986.

下の海域が見られたが，その他では30～31‰であった。しかし，7月中旬になると塩分低下が起こり，灘全域で30‰以下となった。特に灘西部から南部にかけての沿岸域における塩分低下が著しく，20‰を下回る海域も見られた。8月上旬になると塩分低下の回復が見られたが，灘西部から南部では依然として30‰以下であった。8月下旬になると完全に塩分低下は解消され，灘全域で31～32‰となった。

塩分の鉛直断面をFig. 3 9に示す。6月下旬には灘西部及び南部の表層付近で若干の塩分

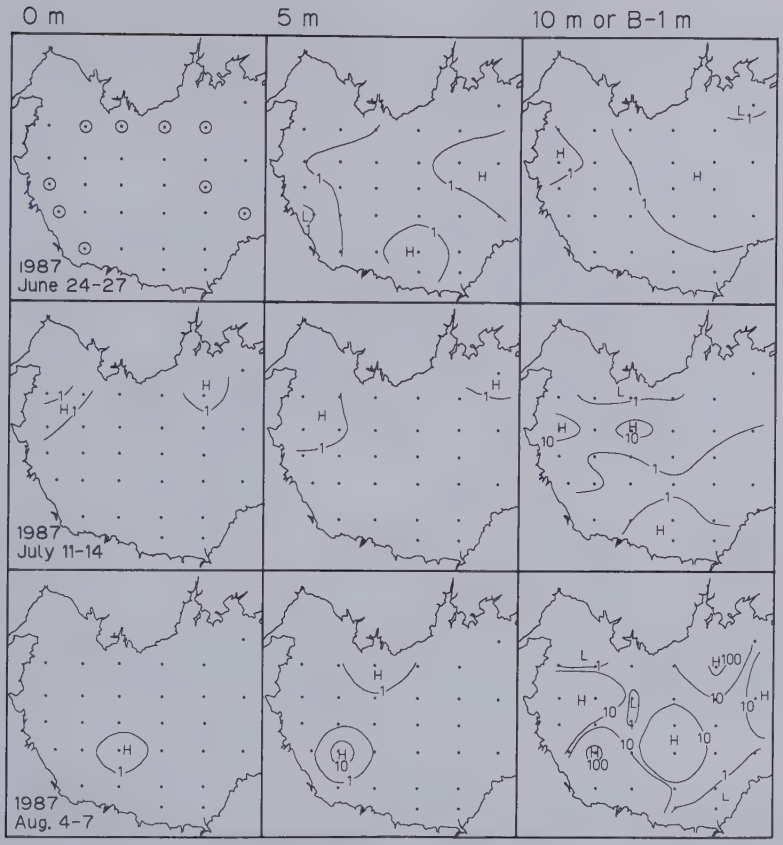


Fig.3-10. Horizontal distributions of vegetative cells of *G. nagasakiense* at 0 m, 5 m, and 10 m or B-1m depth during the summer in 1987. Numerals show the cell number (cells ml^{-1}). Circled dots at 0 m in June 24-27 indicate the station where vegetative cells were detected (less than 0.5 cells ml^{-1}).

低下が見られたものの，表層から底層まで31～32‰であった。7月中旬になると表層から5m層にかけて塩分が低下したが，29‰以下となったのはごく表層に限られた。そのため顕著な密度躍層は発達しなかった。8月上旬になると，灘西部の10m以浅及び南部沿岸域で30‰以下の海域が見られたものの，その他の海域では31～32‰であり，低塩分は解消されつつあった。8月下旬には全域で31～32‰台となり，低塩分は完全に解消した。

底層における溶存酸素飽和度の分布をみると(Fig. 3-7)，6月下旬には全域で飽和度は70%以上であり，北部及び南部の沿岸域で高かった。7月中旬には灘西部から南部にかけて40%を下回る海域が見られたものの，北部ではかなり高く，1985年のような顕著な酸素飽和度の低下は見られなかった。8月上旬もほぼ7月調査時と同様の傾向が見られ，灘南部域では40%以下と低く，灘北部で高かった。8月下旬になると灘中央部から東部にかけての灘深部で飽和度は40%以下となったが，それ以外の沿岸部では比較的高かった。

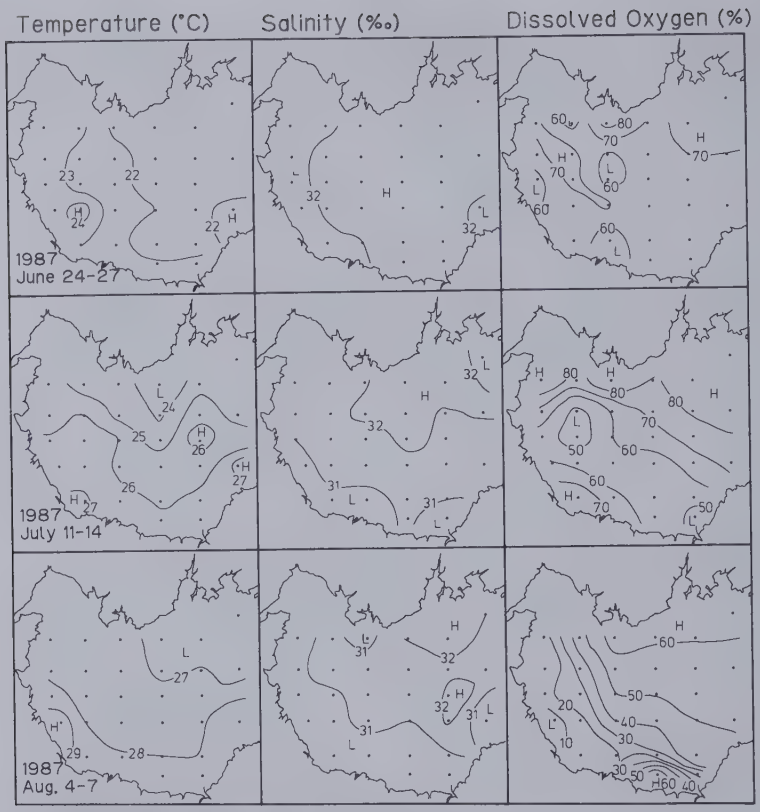


Fig.3-11. Temperature and salinity at the surface and dissolved oxygen at the bottom during the summer in 1987.

3. 1987年全域調査

（1）*G. nagasakiense* の分布

G. nagasakiense の水平分布を Fig. 3-10に示す。6月下旬の表層では灘北部，南西部及び東部の一部で1 cell ml^{-1}程度存在した。5 m以深でも同様の傾向が見られたが，底層ほど分布範囲が広い傾向が見られた。1987年は7月中旬になっても細胞密度の増加が見られず，5 m以浅では灘西部及び北東部の狭い範囲で1 cell ml^{-1}以上となったに過ぎなかった。しかし，10 m（B-1m）層では灘西部から北東部にかけて帯状に1 cell ml^{-1}を越える海域が見られ，一部の定点では10 cells ml^{-1}を上回る所もあった。8月上旬になると，5 m層以浅では依然として分布が局所的であり，数定点でのみ細胞が確認されるに留まった。しかし，10 m（B-1m）層ではほぼ全域で1 cell ml^{-1}を越えており，灘西部から南部，中央部及び北東部で10 cells ml^{-1}を越える密度で存在した。1987年の特徴として，過去2年間に比べ *G. nagasakiense* の増殖時期が遅かったこと，表層での増殖が見られなかったこと，細胞密度が低かったことが挙げられる。以上の

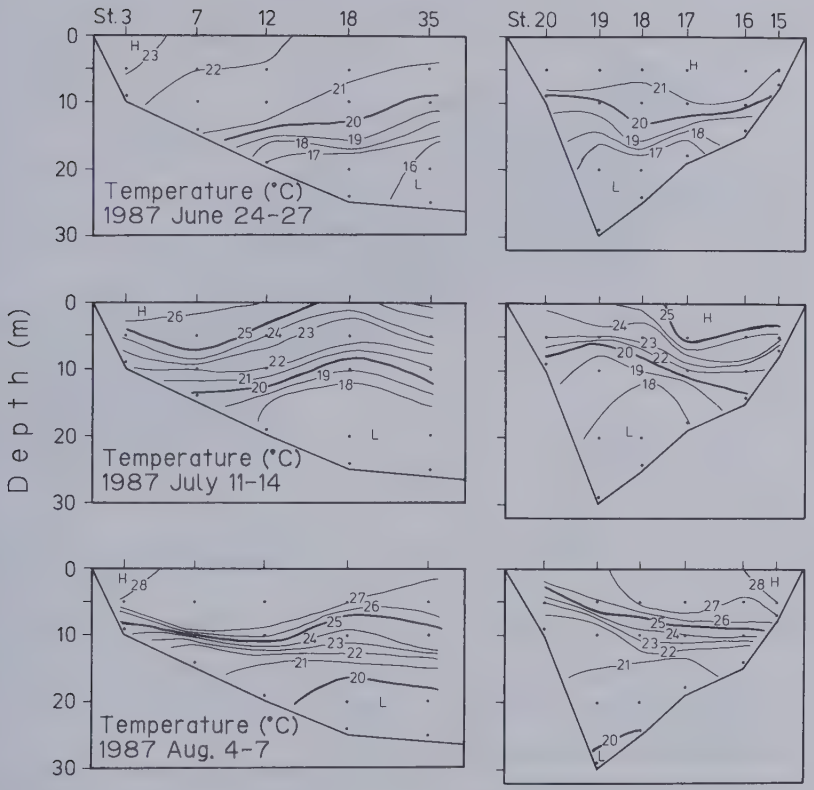


Fig.3-12. Vertical distributions of temperature along the east to the west (left panel) and the south to the north (right panel) transections during the summer in 1987.

ことから1987年は赤潮非発生年であったと言える。

（2）水温，塩分及び溶存酸素

表層水温の水平分布をFig. 3-11に示す。6月下旬における水温は22～24℃で灘西部で高かった。7月中旬になると24～27℃となり，灘西部から南部沿岸域で高かった。8月上旬では27～29℃となり，やはり灘西部から南部で高い傾向が見られた。

水温の鉛直断面をFig. 3-12に示す。6月下旬の水温は16～23℃で，15 m付近に弱い躍層が見られた。7月中旬になると18～26℃となり，水温躍層は10 m以浅に上昇した。8月上旬では10 m付近に著しい躍層が発達し，それ以浅では27℃と全体的に水温の上昇が見られた。

表層塩分の水平分布を見ると（Fig. 3-11），6月下旬では32‰台で過去2年に比べ高めに推移した。7月中旬になってもこの高塩分傾向は変わらず，灘南西部から南部沿岸域で若干の低塩分域（<31‰）が見られたのみであった。8月上旬になってもこの傾向は持続した。ただし，灘西部から南部にかけて低塩分域がやや広りを見せていた。

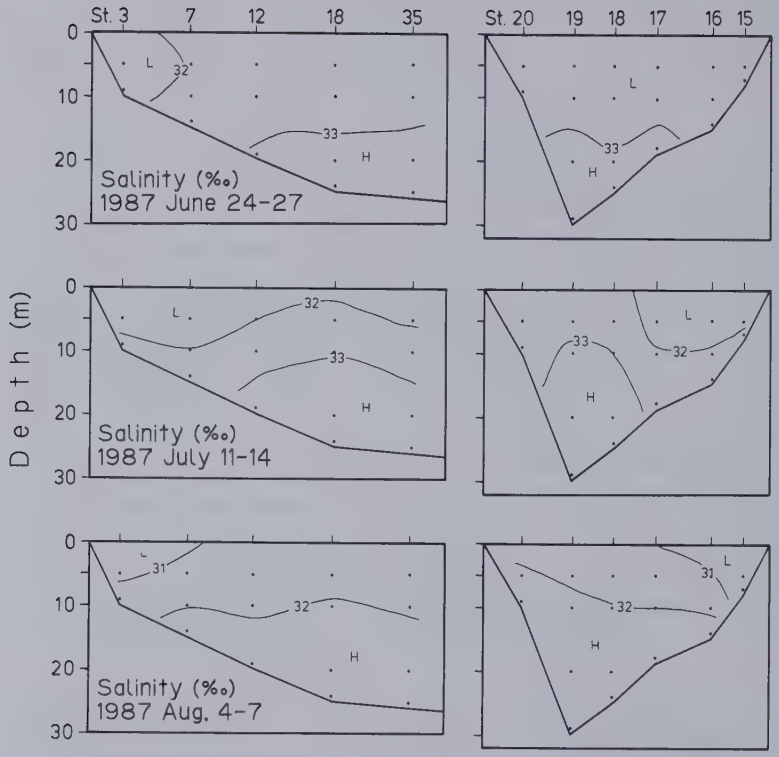


Fig.3-13. Vertical distributions of salinity along the east to the west (left panel) and the south to the north (right panel) transections during the summer in 1987.

塩分の鉛直分布（Fig. 3-13）によれば，1987年は各調査を通して高塩分で推移し，密度躍層は全く見られず，鉛直的に一様な分布を示した。

溶存酸素飽和度の水平分布を見ると（Fig. 3-11），6月下旬には灘全域で60%以上であった。7月中旬になっても飽和度の低下は見られず，ほぼ全域で50%以上であった。しかし，8月上旬になると灘西部から南西部沿岸にかけて飽和度30%以下の海域が見られ始めた。1987年の特徴として底層の貧酸素化の時期が8月上旬で過去2年よりも遅かったことが挙げられる。

4.連続観測結果

宇島港における *G. nagasakiense* の鉛直分布の経時変化を Fig. 3-14に示す。鉛直分布の中心は7月17日の10:00から12:00にかけては6m層あるいは底層（B 1m）であったが，15:00以降には3m層に上昇した。日没後には分布の中心は再び6m層あるいは底層となり，特に04:00にはほとんどすべての細胞が底層に分布した。日の出以降分布の中心は次第に表層付近へ移動する傾向が見られ，18日の09:00には3m層に最も多く分布した。以上の結果から，本種が昼夜

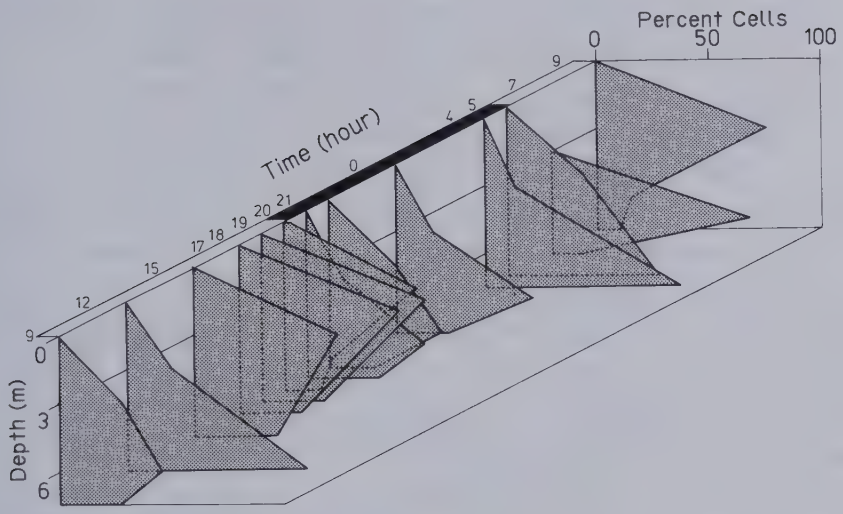


Fig.3-14. Diel changes in vertical distribution of vegetative cells of *G. nagasakiense* at Unoshima Port in July 17-18, 1985.

鉛直移動を行っている可能性が示唆された。ところで，細胞密度が低い場合には本種の鉛直分布の中心は中・底層にあり，赤潮盛期になると表層に分布するようになることが観察されている（池田他 1987，HONJO *et al*. 1990）。宇島港における最高出現密度は715 cells ml^{-1}と赤潮盛期に比べて低く，さらに定点の水深が9 mと浅いこともあって，鉛直移動が明瞭でなかったものと思われる。ただし，本種は *Heterosigma akashiwo* ほど明瞭な鉛直移動の日周性を示さないという報告もある（池田他 1987）。赤潮プランクトンの鉛直移動には光，水温，塩分，pH，溶存酸素及び生物の生理状態など数多くの要因が複雑に絡み合って影響を及ぼしていると考えられることから（米田・吉田 1957，吉田・河口 1983），*G. nagasakiense* の鉛直移動の要因を明らかにするためには，より詳細な調査が必要となろう。

5.周防灘における大規模赤潮発生年の海況的特徴

これまで述べてきたように，この3年間における *G. nagasakiense* 赤潮の発生規模には大規模発生（1985年），中規模発生（1986年）及び非発生（1987年）と極めて特徴的な年変化が見られた。このことから，これら3年間の生物的及び海況的差異を比較することによって，*G. nagasakiense* 赤潮発生のための条件が抽出できるものと考えられる。まず，*G. nagasakiense* の細胞密度の変化であるが，6月の周防灘には各年とも東部及び北部海域に1～5 cells ml^{-1}の密度で栄養細胞の分布が認められた。このように赤潮のシードポピュレーションの分布及び細胞密度には年変化が見られず，大規模赤潮に至るか否かはその後の増殖の程度に依存していることが示唆された。したがって，増殖に及ぼす環境因子を明らかにするため3年間の海況の差を以下に比較検討した。

この3年間で最も異なった環境因子としては塩分が挙げられる。すなわち，1985年及び1986年には6月下旬から塩分の低下（<30‰）が見られ始め，7月中旬には表層塩分は全域で30‰以下となった。また，この低塩分化は鉛直的にも進行し，1985年には10 m層まで，そして1986年には5 m層まで30‰以下の塩分となった。さらに1985年には著しい密度躍層が発達していた。各年における降水量の資料を取りまとめた結果によれば，1985年の降水量は6月21日頃より増加し，その後10日間で約400 mmに達した（伊藤他 1986）。また1986年の6月下旬における降水量は平年値以下であったが，7月上・中旬では平年より多く，特に中旬には平年の2倍以上（350 mm）の降雨が記録されている（伊藤他 1987）。したがって，このような多量の降雨が灘全域に及ぶ低塩分化の原因となったことは間違いない。しかし，1987年には6月下旬にほとんど降雨が無く，7月中旬に200 mm程度の降水量が記録されたものの（板倉他 1988），大規模な低塩分化には至らなかった（Fig. 3-11）。一方，日照時間を見ると，1985年には7月上旬より著しく増加したことが報告されている（伊藤他 1986）。また，1986年にも7月下旬から8月上旬にかけて晴天の日が多かったようである（伊藤他 1987）。これらのことから，周防灘における *G. nagasakiense* の大規模赤潮発生年の特徴としては，6～7月中旬にかけてのいわゆる梅雨期に多量の降雨があり，それによって著しい密度躍層が発達し，さらにそれがかなり長期間持続するといった海況条件が挙げられる。

著しい密度躍層が形成されると水塊の鉛直安定度が増大し，表層水と底層水との混合が悪くなる。さらに多量の降雨によって陸上から流入した有機物が沈降・分解することによって，底層に貧酸素水塊が形成される。実際に，1985年には灘南部全域にわたって著しい溶存酸素飽和度の低下が見られている（Fig. 3-3）。このような溶存酸素の低下は海底泥からの各種栄養塩及び増殖促進物質の溶出を引き起こすことが知られている（HIRAYAMA and NUMAGUCHI 1972，本城 1979）。ちなみにこの3年間の栄養塩（DIN及びPO_4-P）の平年値に対する偏差を伊藤他（1990）に基づき Tabel 3-1に示した。Tabel 3 1から明らかなように，1985年及び1986年の6，7月には平年値をはるかに上回る栄養塩が存在していたことが判る。これらの栄養塩は降雨に伴う陸上からの補給に加えて，前述のように貧酸素化に伴う底層からの溶出もかなり寄与しているものと思われる。このように，1985年と1986年の赤潮は飯塚・入江（1969b）が大村湾で述べているような「降水性赤潮」と「無酸素化関連赤潮」の両側面を備えているようである。すなわち，周防灘の場合には降雨と貧酸素水塊の形成及びその規模の拡大とが関連しており，それらが赤潮の発生に影響を及ぼしているものと推察される。伊藤他（1990）は，過去12年間の資料を整理し，周防灘において発生した *G. nagasakiense* 赤潮は，1978年の一例を除き，常に平年値を大きく上回る集中的な降雨の後で発生することを認めている。

今井（1990）は周防灘のこの3年間における *Chattonella* の出現の年変化を調べている。それによれば，1985年及び1986年には濃縮によって辛うじてその栄養細胞が検出できる程度であったのに対して，1987年には7月中旬から8月上旬にかけて10^2 cells ml^{-1}以上の増殖が見られている。このような出現パターンは *G. nagasakiense* の場合とは全く逆であり，両種が増殖生理的に異なることを示唆するものである。彼は *Chattonella* の出現を左右する環境因子として日

Table 3-1. Summary of DIN and PO_4-P concentrations (comparison with average year) at surface and bottom waters in Suo Nada from 1985 to 1987. Numerals indicate μM. Symbols + and ± show more than and same as average year, respectively. (after ITOH *et al.* 1990)

			1985	1986	1987
June	Surface	DIN	+ 6.0	+ 5.0	±
		PO_4-P	+ 1.0	+ 0.1	±
	Bottom	DIN	+ 4.0	+ 2.0	±
		PO_4-P	+ 0.5	+ 0.3	±
July	Surface	DIN	±	+12.0	±
		PO_4-P	+ 0.1	+ 0.8	±
	Bottom	DIN	+10.0	+ 3.0	+10.0
		PO_4-P	+ 0.3	±	+ 0.2
Aug.	Surface	DIN	±	±	±
		PO_4-P	±	±	±
	Bottom	DIN	±	±	±
		PO_4-P	±	±	+

照時間が重要であると考察している。

以上の結果をまとめると，周防灘における *G. nagasakiense* の大規模赤潮発生は次のような過程を経て引き起こされたものと考えられる。まずシードポピュレーションとしては6月下旬にすでに灘全域に分布していた *G. nagasakiense* の栄養細胞が挙げられる。その後水温の上昇につれて本種の増殖に好適な水温条件が整えられて行く。梅雨期（6月から7月中旬）における多量の降雨は陸上からの栄養塩の供給を行うとともに，灘全域に及ぶ低塩分化をもたらす。加えて梅雨後の日射量の増加によって表面水温が上昇し，著しい密度躍層を発達させる。このような水塊の鉛直安定度の増加は渦鞭毛藻の増殖に有効となることが知られている（POLLINGHER and ZEMEL 1981）。また底層の貧酸素化によって海底泥からの栄養物質の溶出が促進されることで，栄養環境的にも本種の増殖に好適な環境が形成される。さらに低塩分そのものも本種の増殖に有効であることも考えられる。このような環境下で，*G. nagasakiense* は昼間は光合成に適度な光条件を求めて表・中層に集まり，夜間は栄養塩が豊富な底層に移動するといった鉛直移動を行いながら個体群密度を増大させる。多量の降雨はその裏返しとして日照時間の減少をもたらし，他の植物プランクトンの増殖には不適な環境となり，競合種の排除に役立つであろう。1985年と1986年における *Chattonella* の出現密度の低下はこのことを示唆している（今井 1990）。以上のような過程を経て *G. nagasakiense* の赤潮が形成されていったものと考えられる。

第2節　浦ノ内湾における出現の季節変化

浦ノ内湾は土佐湾のほぼ中央に位置し，東西方向に横たわる半島によって外海から隔たれた深い入江であり，行程はほぼ12 kmである。本湾は沈降性峡湾であるため，湾内には多くの枝湾が発達している。湾口には大きな砂州が発達しており，水深は最深部で17～19 mである。また流入河川がないため，水質の激変は梅雨時，豪雨時にみられる（大野他 1971）。面積は約10 km^2である（高知県水産試験場 1979）。

浦ノ内湾では大正時代から真珠養殖が行われていたが，1966年の水揚げピーク以降減少し，現在ではほとんど行われていない。これに代わって1967年以降大規模なハマチ養殖が行われるようになったが（西島 1985），閉鎖水域であるため赤潮の発生，水質の悪化及び魚病の蔓延等をきたしている（高知県水産試験場 1979）。特に *G. nagasakiense* 赤潮は高知県が水産庁の赤潮情報交換事業に参加した1978年以降では，1978，1980，1981，1982，1988，1989年に発生しており，そのほとんどでハマチ等への漁業被害を引き起こしている（水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 1979～1990）。

本湾は前述のようにかなり閉鎖性が強く，また流入河川の影響がほとんど無いなど周年にわたって植物プランクトンの出現を調査するのに非常に適した内湾と言える。本節では同湾を対

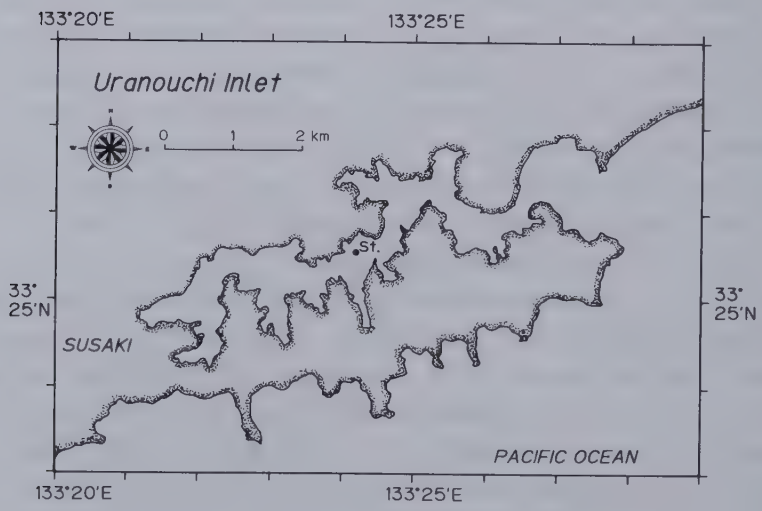


Fig.3-15. Location of the sampling station in Uranouchi Inlet, Kochi Prefecture.

象水域として一年間にわたり高頻度で調査を実施し，*G. nagasakiense* 及びその他植物プランクトンの出現生態を調査した結果について述べる。

調査方法

現場調査は1989年4月から1990年4月の一年間にわたり，浦ノ内湾中央部に設けた定点（Fig. 3-15）で高知県水産試験場の協力のもとで実施された。調査間隔は春季から秋季にかけては毎週一回，冬季には隔週に一回とした。定点の0，2，5，10，B-1m層より採水を行い，調査日に保温容器に梱包されて宅配便にて南西海区水産研究所に送付された。採水時に各層における水温と塩分の測定も実施した（サリノメーター，EIL社 Type MC-5）。調査日の翌日採水試料が水産研究所に到着した後，その各層ごとの生試水の各々1 m*l*を数回検鏡し，*G. nagasakiense* 及び珪藻類の細胞数を計数した。生海水中で *G. nagasakiense* が検出できなかった場合には各層試水を混合し，ガラス繊維濾紙（Whatman GF/C，ϕ150 mm）によって常圧濃縮後（濃縮率は約30～1,400倍）検鏡を行った。

結果及び考察

浦ノ内湾における水温と塩分の季節変化をFig. 3-16に示す。まず同湾における水温は11.9～29.5℃の範囲で推移した。季節的にみると，4月上旬から6月下旬にかけては水温は鉛直的に一様な分布を示したが，7月上旬から成層が発達し始め，表層ほど高温となった。表層と底層との水温較差は最大5℃程度であった。最高水温は8月上旬に見られた。その後，9月中旬になると成層が崩れ，鉛直的にほとんど一様な分布となり，混合期の開始が示唆された。10月から12月下旬にかけて水温は急激に低下し，1～2月に最低水温期を経た後，翌年3月頃から再び水温が上昇し始め，4月までその状態で推移した。一方，塩分の推移をみると4月は比較

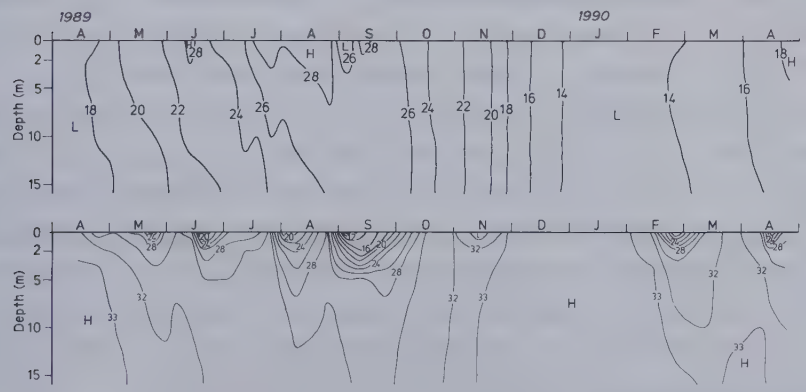


Fig.3-16. Seasonal changes in temperature (℃: upper panel) and salinity (‰: lower panel) in Uranouchi Inlet during the period from Apr. 1989 to Apr., 1990.

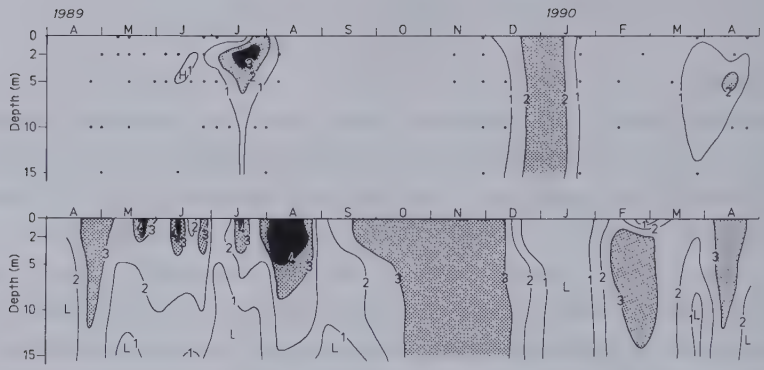


Fig.3-17. Seasonal changes in cell density of *G. nagasakiense* (upper panel) and diatoms (lower panel) in Uranouchi Inlet during the period from Apr. 1989 to Apr., 1990. Numerals in the contour indicate the log number of cells per milliliter. Dots in the upper panel indicate that the log number of *G. nagasakiense* cells are less than 1.0.

的高塩分であったが，5月から10月中旬にかけては2～5m層以浅で塩分の低下（<30‰）がしばしば見られた。特に8，9月にはかなりの低塩分で推移し，鉛直的には塩分躍層が発達していた。一方，5m以深では周年にわたり塩分較差が小さく，低塩分は9月に，また高塩分は12月から1月にかけて認められた。10月中旬以降では鉛直混合によって塩分の分布は一様となり，この傾向は2月上旬まで続いた。その後，3月には表層で若干の塩分低下が見られたものの，比較的高塩分で推移した。以上の結果から，浦ノ内湾の水温・塩分環境は高水温期には低塩分，低水温期には高塩分といった内湾域に一般的に見られる傾向を示すことが判明した。

同湾における *G. nagasakiense* 及び珪藻類の細胞密度の季節変化を Fig. 3-17 に示す。調査期間を通して生海水中に栄養細胞が観察されなかったのは1989年8月24日から10月30日までの期間であった。また，濃縮試料によっても *G. nagasakiense* が観察されなかったのは1989年9月5日と25日の2回の調査のみ（濃縮率はそれぞれ1,250倍，860倍）であった。しかしその前後の調査日には細胞が観察されていることから，これらの2回の際にも非常に低密度で存在していた可能性がある。したがって，浦ノ内湾では周年にわたって *G. nagasakiense* の栄養細胞が存在するものと考えられる。他海域においても冬季に本種の栄養細胞が観察されており（中田・飯塚 1987，寺田他 1987，Honjo *et al*.1990，板倉他 1990，保坂 1990），ある程度以上の水温が保証される海域では本種は栄養細胞で越冬するものと考えられる。浦ノ内湾の沖合い海域である土佐湾において *G. nagasakiense* の分布調査を行った結果によれば，ごく沿岸域を除いて栄養細胞は観察されていない（高知県水産試験場 1988）。したがって，同湾における *G. nagasakiense* 赤潮は湾内に存在する細胞を起源としているものと思われる。

遊泳細胞が比較的高密度（$>10^2$ cells ml^{-1}）となったのは，1989年7～8月，同年12月中旬から1990年1月下旬及び1990年4月中旬の計3回であった。その際の水温・塩分条件は，それぞ

れ23～29.2℃と19～31.7‰（7～8月），12.3～14.3℃と33.4～33.7‰（12～1月），15.3～17.4℃と20.5～33.1‰（4月）であった。最高出現密度は7月17日の2m層で観察された3,750 cells ml^{-1}であった。また鉛直分布の中心は，表面から海底まで一様であった12～1月の場合を除き，2～5m層にあった。HONJO *et al*.（1990）によれば，*G. nagasakiense* の鉛直分布はその細胞密度によって分布層が異なり，10^3 cells ml^{-1}以下では5～10m層に，それ以上の細胞密度では0～2m層に多く分布するとされている。また大村湾では分布の中心が10m層にあるとされており（飯塚・入江 1969b），増殖段階及び海域によって分布層が異なる可能性がある。さらにこのような分布層はその時点における日射量によっても影響される可能性がある。実際に1985年の周防灘における大規模赤潮の際には *G. nagasakiense* の鉛直分布が天候によって変化し，晴天時には中層で，また曇天時には表層に分布することが観察された。したがって，このような鉛直分布を説明するためには光条件に対する本種の増殖応答を明らかにする必要があろう。

珪藻類の出現の季節変化を見ると（Fig. 3-17），4月の下旬に *Skeletonema costatum* 及び小型の *Nitzschia* sp. による10^3cells ml^{-1}を越える増殖が見られたが，それ以降8月の初めまでは表層における散発的な増殖に終始した。この期間の主たる構成種は小型の *Chaetoceros* spp. 及び *Nitzschia* spp. であった。また降雨による表層塩分の低下の後にそれらの増殖が見られる傾向があり，陸上からの栄養塩の補給にその増殖が依存していることがうかがえた。8月に入ると10^4cells ml^{-1}を越える増殖が見られたが，この際にも微細な *Chaetoceros* spp. が主体であった。その後一時的に細胞密度は減少したが，9月下旬から12月上旬にかけては表層から底層に及ぶかなり大規模な増殖が見られた。この期間の構成種は，前半は *Leptocylindrus* sp. 及び *Hemiaulus* sp. で，また後半は *Nitzschia* spp., *Chaetoceros* spp., *Asterionella japonica* が主体であった。この時期は混合期であり（Fig. 3-16），温帯域に見られるいわゆる秋のブルームと考えられる。12月から2月中旬にかけては細胞密度はかなり減少したが，それ以降 *S. costatum* を主体とした増殖が2月後半と4月に観察された。珪藻類の増殖時期の水温をみると14～26℃で（Fig. 3-16），高水温期及び低水温期での出現は少なかった。

G. nagasakiense の出現の季節変化と珪藻類のそれとを比較すると，両者の出現には負の相関関係が見られた。すなわち，*G. nagasakiense* は珪藻類の細胞密度が低い場合に多く出現する傾向が見られた。このことは両者の間に何等かの競合関係が存在するか，あるいは両者が増殖生理的に異なった特性を有することを示唆するものである。

以上のように浦ノ内湾においては *G. nagasakiense* は周年存在し，夏季及び冬季の増殖はそれらの細胞に起因していることが示唆された。また，珪藻類との間に何等かの競合関係が存在することが示唆されたことから，培養実験によるその要因の解明が必要となろう。

第Ⅳ章　*Gymnodinium nagasakiense* の増殖に及ぼす物理・化学的要因

赤潮の発生機構を解明するための研究法には大きく分けて二つの取り組み方がある。その一つは，海況・気象条件などの環境因子の変動と赤潮発生との因果関係を明らかにしようとする環境面からの調査・研究であり，もう一方は赤潮原因生物の増殖生理や生態の解明といった生物学的方面からのアプローチである（岩崎 1973）。赤潮現象は様々な因子が複雑に絡み合って起こると考えられることから，環境面からの研究のみでは不十分であり，生物的な面も含めた両側面からの研究が有機的に連携される必要がある。前章（第Ⅲ章）では，現場調査に基づき *G. nagasakiense* の大規模赤潮発生年における海況的特徴を明らかにするとともに，*G. nagasakiense* と他種植物プランクトンとの間に種の交替現象が見られることを示した。このような現場調査は前者の環境面からの取り組み方と位置付けられる。しかし，生理学的な裏付けがなされなければ，現場海域で赤潮現象と環境因子との相関関係が得られたとしても，単なる現象の記載に終わってしまうであろう。したがって，現場調査から得られた環境因子と *G. nagasakiense* の相互関係に対して直接的な証拠を提供するために，実験的な解析が必要となる。

赤潮は海水が着色するほど微細藻類が増加する現象であることから，その原因生物が高密度に増殖することが必要条件であることは言うまでもない（岩崎 1973）。したがって，赤潮の発生機構を論ずる上で，その種の増殖最適条件を明らかにすることが第一に重要な課題となる。ところで，赤潮現象は微細藻類の大増殖のみならず，特定種による場の独占という生態学的な特徴を有する。Gause の競争排除則（Competitive exclusion principle）に従えば，類似した生理要求を持つ2種は同じ生息場で共存できない（HARRIS 1986）。このことは赤潮形成種と他種との間に何等かの生理特性の差異が存在することを意味する。したがって，赤潮形成種及びそれと競合関係にある他種植物プランクトンの生理特性を比較検討する必要が生ずる。代表的な赤潮ラフィド藻である *Chattonella antiqua* や *Heterosigma akashiwo* については，その増殖特性がかなり明らかにされている（岩崎・佐々田 1969，岩崎 1971，TOMAS 1978，1979，1980，WATANABE *et al.* 1982，NAKAMURA and WATANABE 1983a，b）。しかし第Ⅰ章で述べたように *G. nagasakiense* に関する知見は非常に少ない。

自然条件下では赤潮原因藻も他の植物プランクトンと同様，光，水温，塩分，栄養塩，種間競合や捕食圧等，様々な環境因子の制約の下にある。そのような中で赤潮原因種が大増殖に至るためには，それらの制限因子からの解放が必要となる。したがって，赤潮の発生機構を知るためには，どのような環境因子が増殖の制限要因になっているのかを明らかにしておくことが重要である。ここで言う制限要因とは，Liebig の最小律で定義されるような因子の欠乏のみを指すのでなく，過剰な場合の影響もそれに含められるべきである。例えば，高濃度のアンモニア態窒素によって藻類の増殖が阻害されるような場合（NAKAMURA and WATANABE 1983b）がそれに相当するであろう。このように制限要因はある範囲，すなわち耐性限界（生物が耐え

られる上限と下限），と解釈すべきであると考えられる。さらに，環境因子間に相互関係があり，ある因子の変化に伴って別の因子に対する最適条件や耐性限界が変化する可能性があることに注意しておく必要がある。

以上の観点から，本章では赤潮原因藻を分離して無菌培養によってその生理生態特性を定量的に明らかにし，増殖生理の面から赤潮の発生に必要な条件を解明することを目的とした。まず第1節で光強度，水温及び塩分が増殖速度に及ぼす影響を明らかにするとともに，それらの関係の定式化を行った。第2節と第3節では *G. nagasakiense* と出現の交替現象が見られた *Chattonella* spp. 及び珪藻類の増殖生理を調べ，*G. nagasakiense* との競合関係を比較検討することによって本種の生理・生態特性について論じた。第4節では形態別に栄養塩の利用能を調べ，その結果に基づき栄養塩制限下における増殖の動力学を解析した。これらの結果から増殖特性，すなわち増殖最適条件及び耐性限界，を明らかにすることによって，赤潮の発生機構について考察した。

第1節　*G. nagasakiense* の増殖に及ぼす光強度，水温及び塩分の影響

光は光合成を行う植物プランクトンにとって最も基本的な因子であるし，水温は細胞内の物質及びエネルギー代謝に関わる各種の生化学反応を通じて増殖に影響を及ぼすであろう。また塩分は細胞内成分や浸透圧に対する作用を通じて影響を及ぼすことが考えられる。このように光，水温及び塩分は植物プランクトンの増殖に影響を及ぼす物理的な環境因子の中でとりわけ重要な因子であると言える。また，これらの環境因子が植物プランクトンに対して相乗的あるいは干渉的に作用することが報告されている（Tomas 1978, Norris and Chew 1975）。

前章（第III章）では現場調査を通じて，赤潮発生時における水温，塩分等の海況的特徴，栄養細胞出現の季節変化，鉛直分布及び他種植物プランクトンとの相互関係等，*G. nagasakiense* の生態的特性が明らかにされた。本節ではこれらの結果を踏まえ，*G. nagasakiense* の培養株を用いてその増殖に及ぼす光強度，水温及び塩分の影響を調べ，増殖特性から見た本種の赤潮発生機構について考察する。

材料及び方法

1. 供試株と培地

実験に用いた *G. nagasakiense* は1985年に周防灘より分離し，マイクロピペット洗浄法（岩崎 1967）により無菌化したクローン株（G303 AX-2株）である。継代培養及び実験には海水強化培地である改変 SWM-3（Chen *et al.* 1969, 伊藤・今井 1987）を用いた。無菌検査は SWM-3 を基本とした ST10 培地（Ishida *et al.* 1986）による培養法及び DAPI 染色による細菌の直接観察法（今井 1984）によった。

2. 増殖速度に及ぼす光強度の影響

光強度100 μE $m^{-2}s^{-1}$で前培養を行った *G. nagasakiense* を培地300 m*l*（塩分は31 ‰）を分注

した500 ml 容の三角フラスコ10本に接種した。培養温度は25℃，光強度は10 μE m^{-2}s^{-1}から190 μE m^{-2}s^{-1}までの10段階で培養を行った。光源は白色蛍光灯によった。また，明暗周期は14hL：10hDとした。培養開始後15日間にわたり1日おきに細胞数を計数し，片対数グラフにプロットした。その直線部分（対数増殖期）について最小自乗法により増殖速度（μ；divisions day^{-1}）を計算した（GUILLARD 1979）。すなわち，

$$\mu = \frac{n\sum_{i=1}^{n}(t_i \ln C_i) - (\sum_{i=1}^{n} t_i)(\sum_{i=1}^{n} \ln C_i)}{[n\sum_{i=1}^{n}(t_i^2) - (\sum_{i=1}^{n} t_i)^2] \ln 2} \qquad (1)$$

ここで，t_iは培養日数（day），C_iはt_i日における細胞数（cells ml^{-1}），nはサンプル数をそれぞれ示す。増殖速度と光強度の関係式には，(2)式で表せる直角双曲線モデル（LEDERMAN and TETT 1981）を改変したモデルを適用した。

$$\mu = \mu_m \frac{I - I_0}{(K_s - I_0) + (I - I_0)} \qquad (2)$$

ここで，μは増殖速度（divisions day^{-1}），Iは光強度（μE m^{-2}s^{-1}），I_0は光強度のいき値，μ_mは最大増殖速度，K_sは$\mu_m/2$を与える光強度をそれぞれ示す。そして(2)式への当てはめは，次の関数f（μ_m，I_0，K_s）を最小にするパラメータの値をシンプレックス法による逐次計算によって求めることにより行った。

$$f(\mu_m, I_0, K_s) = \sum_{i=1}^{n} [\mu_i - \mu_m (I_i - I_0) / (K_s + I_i - 2I_0)]^2$$

ここでμ_iは増殖速度，I_iは光強度の測定値である。

3. in vivo クロロフィル蛍光による増殖速度の測定

細胞数の計数に代わるより迅速で簡便な生物量の測定法として，in vivo クロロフィル蛍光による増殖速度測定法（BRAND *et al.* 1981）の検討を行った。培地3 liter を入れた平底フラスコに *G. nagasakiense* を接種し，温度22℃，光強度100 μE m^{-2}s^{-1}，12hL：12hDの明暗周期で培養を行った。1日おきに培養の一部を取り出して細胞数及び in vivo クロロフィル蛍光の測定を行い，培養日数の経過に伴う両者の変化を調べた。蛍光値は蛍光光度計（TURNER DESIGNS 社製 model 110）で，細胞数は検鏡によってそれぞれ測定した。

4. 増殖に及ぼす水温と塩分の影響

水温と塩分の影響は2因子要因計画実験によって調べた。SWM-3培地の塩分濃度は基本海水を超純水により希釈し，10，15，20，25，30‰の5段階に調整した。また培養温度は，10，15，20，25，30℃の5段階に設定した。培養実験はこれら水温と塩分のすべての組合せ，すなわち25通りについて実施した。保存株をこれらの実験条件に馴致させるため，以下の継代培養

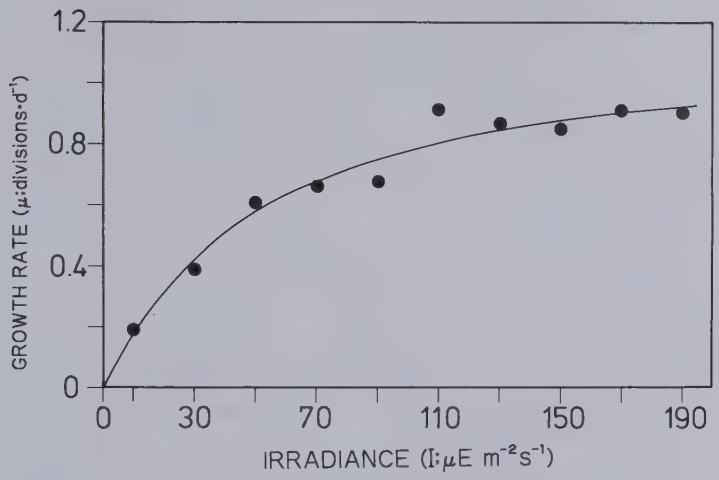


Fig.4-1. Effect of irradiance (I) on the growth rate of *G. nagasakiense* (μ).

を約三ヵ月間行った。まず温度については，保存株の培養温度である22℃から少しづつ温度を上昇あるいは下降させながら実験温度条件に馴致させた。次に各温度で増殖した細胞を5段階の塩分濃度の培地に接種した。ただし10‰については15‰で増殖した細胞を接種した。以上の操作で増殖したものを前培養とした。本培養は培地4 m*l*を分注したPPキャップ試験管（13×120 mm）に前培養を1 m*l*接種し（3本立て），光強度120 μE m^{-2}s^{-1}，明暗周期12hL:12hDで前培養と同じ温度で行った。接種細胞密度は，20℃以上の実験区については10～90 cells ml^{-1}（平均50 cells ml^{-1}），15℃以下では80～150 cells ml^{-1}（平均100 cells ml^{-1}）であった。培養開始後1日おきにin vivoクロロフィル蛍光を蛍光光度計によって測定した。増殖速度は(1)式の細胞数に蛍光値を代入して計算した。また定常期の最大蛍光値を最大収量とした。

結　果

1.増殖速度に及ぼす光強度の影響

G. nagasakiense の増殖速度と光強度の関係をFig. 4-1に示す。増殖速度は光強度とともに増加したが，110 μE m^{-2}s^{-1}以上では約0.9 divisions day^{-1}で飽和した。また，実験した最低光強度10 μE m^{-2}s^{-1}でも0.19 divisions day^{-1}の増殖速度が認められた。逐次計算によって得られたμ_m，K_s及びI_0はそれぞれ1.19 divisions day^{-1}，53.2 μE m^{-2}s^{-1}，0.7 μE m^{-2}s^{-1}であり，増殖速度と光強度の関係は次の式で表せることが明らかとなった。

$$\mu=\frac{1.19\ (I-0.7)}{51.8+I}$$

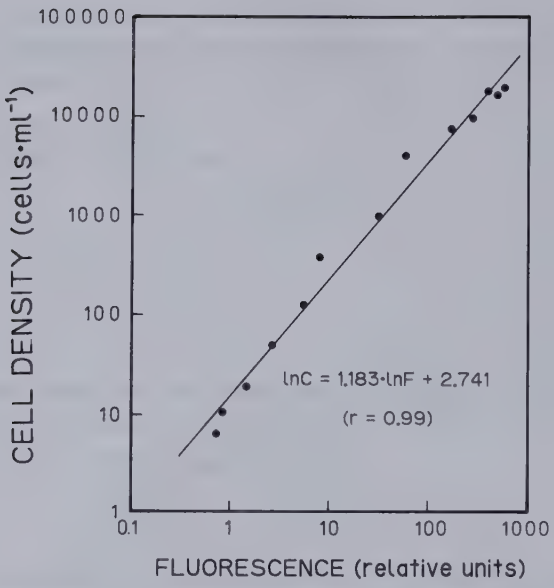


Fig.4-2. Relationship between cell density (C) and in vivo chlorophyll fluorescence (F) in *G. nagasakiense* cultures.

以上の結果に基づき，水温と塩分の影響を調べる実験は増殖速度が飽和する光強度110 μEm^{-2}s^{-1}以上で実施した。

2.増殖に及ぼす水温と塩分の影響

G. nagasakiense の増殖に伴う細胞密度（C）と in vivo クロロフィル蛍光（F）の変化をFig. 4-2に示す。両者の間には次式で示されるような高い相関関係が認められた。

$$\ln C = 1.183 \ln F + 2.741 \quad (r^2 = 0.980)$$

このことから，増殖速度の測定には細胞数の代わりに蛍光値が使用できることが判明した。

各水温及び塩分条件下で培養した *G. nagasakiense* の増殖曲線を Fig. 4 3に示す。なお前培養において増殖が認められなかった実験区については本培養は行わず，増殖速度は 0 とした。まず水温が30℃の場合は，塩分15 ‰と10 ‰での増殖は観察されなかった。塩分が30 ‰及び25 ‰では誘導期もなく，15～20日まで指数関数的な増殖が見られた。次に水温が25℃の場合は，15 ‰以上の塩分でやはり指数関数的な増殖が見られ，増殖速度も大きかった。この場合も塩分10 ‰での増殖は認められなかった。水温が20℃の場合は，25℃に比べるとやや増殖速度は低下し，特に15 ‰では誘導期が長くなった。水温が15℃の場合には，20℃に比べていずれも誘導期が長く，また増殖速度も小さくなり，定常期に達するのに40～50日要した。10℃の場合は塩分25 ‰以上でのみ増殖が観察された。いずれの温度でも10 ‰での増殖は見られなかった。

先の増殖曲線から増殖速度と最大収量を求め，その結果を水温と塩分の 2 因子要因計画（繰

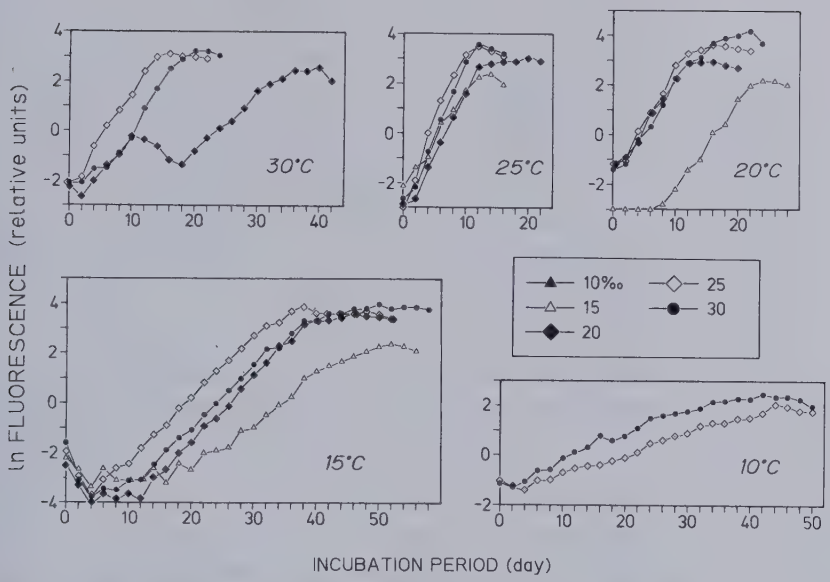


Fig.4-3. Growth curves of *G. nagasakiense* grown under various temperature and salinity combinations. Growth expressed as natural logarithm of in vivo chlorophyll fluorescence intensity averaged over three replicates.

Table 4-1. Summary of two-way analysis of variance of the growth rate and the maximum yield of *G. nagasakiense* as a function of temperature, salinity and their interaction.

Variables	Source of variation	d.f.	Sum of squares	Mean square	F
Growth rate	Temperature	4	3.104	0.7761	1261.41***
	Salinity	4	3.043	0.7608	1236.69***
	Interaction	16	1.199	0.0749	121.79***
	Error	50	0.031	0.0006	
	Total	74	7.377		
Maximum yield	Temperature	4	7301.1	1825.3	33.69***
	Salinity	4	15630.0	3907.5	72.13***
	Interaction	16	4309.3	269.3	4.97***
	Error	50	2708.6	54.2	
	Total	74	29949.0		

*** Significant at the 1% level

り返しは完全無作為化）として解析した（Table 4-1）。増殖速度の場合も最大収量の場合も同様に，水温及び塩分の各々の主効果とそれらの交互作用が有意水準１％で有意であった。したがって，水温と塩分の２つの因子が相互に関連しながら *G. nagasakiense* の増殖に影響を及ぼしていることが明らかとなった。また平均平方でみると，増殖速度に及ぼす水温と塩分の効果はほぼ等しいことが判明した。しかし，最大収量に関しては塩分の効果の方が大きかった。

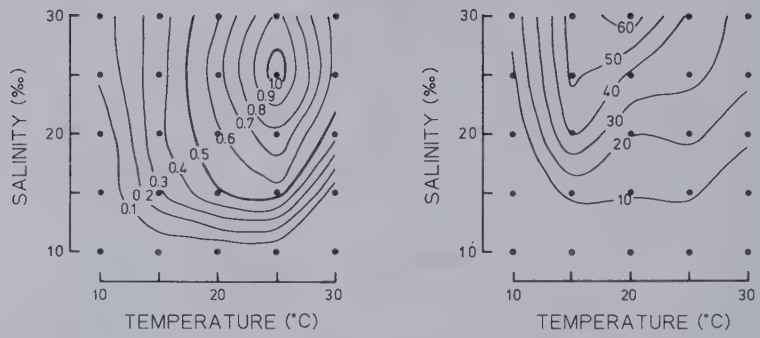


Fig.4-4. Contour plots of the growth rate (divisions day^{-1}) (left) and final cell yield (×10 relative fluorescence units) (right) of *G. nagasakiense* grown at various temperature and salinity combinations.

Fig. 4 4に水温と塩分の組合せに対する増殖速度及び最大収量の等値線を示す。最大増殖速度を与える水温と塩分の組合せは25℃，25‰であった。また，温度が25℃より上昇あるいは下降するにつれて，増殖可能な塩分範囲が狭まる傾向が見られた。一方，最大収量を与える条件は20℃，30‰で，増殖速度の場合とは若干異なっていた。

考　察

ここでは本研究によって得られた水温，塩分及び光強度に対する増殖応答の結果に基づき，本種の増殖最適条件及び耐性限界について検討し，赤潮の発生機構について考察する。

本報告における室内実験で *G. nagasakiense* は10 μE m^{-2}s^{-1}という弱光下でも増殖が可能であり，その増殖速度は110 μE m^{-2}s^{-1}で飽和することが判明した。また，190 μE m^{-2}s^{-1}までは強光阻害は認められなかった（Fig. 4-1）。NAKAMURA and WATANABE（1983a）によれば，わが国の代表的な有害赤潮藻である *C. antiqua* の増殖は0.11 ly min^{-1}以上でみられ，最大増殖速度を与える光強度は0.04 ly min^{-1}とされている。これらの光強度は，波長を550 nmとした場合，それぞれ35 μE m^{-2}s^{-1}，128 μE m^{-2}s^{-1}と換算される（有賀・横浜 1979）。したがって *G. nagasakiense* は *C. antiqua* に比べて弱光下での増殖に有利であると考えられる。ところで，大村湾では水深の2分の1に相当する中層が *G. nagasakiense* の至適環境層であると想定されており（飯塚 1972），HONJO *et al.*（1990）も五ヶ所湾における本種の鉛直分布は10^3 cells ml^{-1}以下の細胞密度の場合には5～10 m深が中心であると報告している。第III章で述べたように浦ノ内湾においても *G. nagasakiense* の鉛直分布の中心は表層ではなく，2～5 mの中層であった（Fig. 3 17）。渦鞭毛藻の増殖は水の攪乱によって阻害されることが室内実験（WHITE 1976, DIXON and SYRETT 1988）や現場海域（POLLINGHER and ZEMEL 1981）で指摘されている。したがって，本種は弱光での増殖が可能であることにより気象・海象の急激な変化が小さい中層域で個体群の増大を可能にし，環境の激変による影響からの回避を行っているものと考えられ

る。このような鉛直分布特性は，鉛直移動と相俟って，移流拡散による個体群の生息場からの消失を防ぐ効果があることも報告されている（ANDERSON and STOLZENBACH 1985）。

G. nagasakiense は水温，塩分単独でみた場合，温度10～30℃，塩分15～30 ‰の範囲で増殖可能であった。また増殖速度の最大値を与える水温と塩分の組合せは25℃，25 ‰であった（Fig. 4-4）。この最適温度条件は，大村湾における *G. nagasakiense* 赤潮発生の最適水温が26～30℃であるという報告（飯塚・入江 1966）とほぼ一致する。またIWASAKI（1979）は総説の中で，赤潮鞭毛藻の増殖最適水温をまとめている。それを参照すると，25℃以上に最適域（増殖速度と最大収量の両方を含む）を有する種は少なく，また増殖可能な温度範囲が *G. nagasakiense* のように20℃にわたる種はほとんどない。したがって，本種が25℃という高い最適温度を有することは，夏季に他の藻類と共存しながら次第に生息場を独占できる重要な要因の一つであると考えられる。

五ヶ所湾においては13～21℃で本種の冬季赤潮が発生しており（本城 1987），また冬季の周防灘沿岸（水温10℃以上）でも10^3 cells ml^{-1}を越える高い細胞密度が観察されている（寺田 他 1987）。これらの赤潮発生時及び冬季の現場観察と本実験結果から，本種は広温性種（eurythermal species）であると判断される。

次に *G. nagasakiense* の低水温に対する耐性と越冬様式について考察する。本実験結果から *G. nagasakiense* は10℃でも十分増殖可能であることが判った。この温度は瀬戸内海における冬季の最低水温（約7℃付近）にほぼ近い（小村 1983）。また，冬季の現場海域で本種の遊泳細胞が確認されており（中田・飯塚 1987，寺田他 1987），五ヶ所湾でも冬季水温が12℃以上の場合には周年遊泳細胞が認められている（HONJO *et al.* 1990）。さらに *G. nagasakiense* については未だシストに関する報告がなく，板倉他（1990）は瀬戸内海の様々な海域から採集した底泥をシスト発芽のために培養しても，*G. nagasakiense* の栄養細胞が出現しなかったと述べている。以上の結果は本種が遊泳細胞の形態で越冬し，それが翌年の赤潮のシードポピュレーションとなる可能性を強く示唆するものである。

G. nagasakiense の増殖速度の温度依存性を調べるためFig. 4-5にアレニウスプロットを示す。25℃以下のデータを用いて計算したQ_{10}は塩分15, 20, 25, 30 ‰についてそれぞれ2.0, 2.0, 4.2, 3.3であった。25 ‰以上での値は植物プランクトンの光合成速度で報告されている2.0～2.3（REYNOLDS 1984）や藍藻の増殖速度の1.5～2.1（FOY *et al.* 1976）に比べて1.5～2倍程度大きい。したがって，25 ‰以上の好適塩分域では，*G. nagasakiense* の増殖速度は温度変化に極めて鋭敏に依存することが判る。

飯塚・入江（1966）は蒸留水希釈海水の方が現場海水よりも培養成績が良いことから，本種が低塩分種であると推測した。培養実験でも大村湾から分離された株は塩素量で11～18.5 ‰に好適領域を有していることが報告されている（沼口・平山 1972）。これは塩分に換算すると19.9～33.4 ‰に相当する。さらに，1984年の熊野灘南部の赤潮時には10^4 cells ml^{-1}以上の細胞密度は18.0～34.0 ‰の範囲に見られている（水産庁他 1986）。したがって，本研究で得られた周防灘産株の結果も合わせて考えると，*G. nagasakiense* は広塩分性種（euryhaline species）

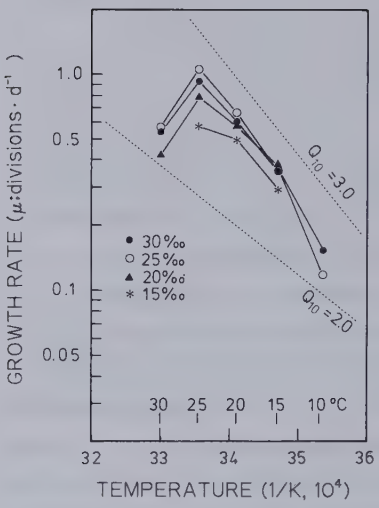


Fig.4-5. Arrhenius plot of the growth rate of *G. nagasakiense* grown in four different salinities. Upper and lower dotted lines indicate theoretical curves the Q_{10} values of which are assumed to be 3.0 and 2.0, respectively.

であり，むしろ低塩分を好む種であると考えられる。これは本種の赤潮が大量の降雨の後に起こるという現場観察ともよく一致する(飯塚・入江 1969，Cho 1981，伊藤他 1986，水産庁他 1986)。

本研究においては塩分10‰の場合，すべての温度条件下で *G. nagasakiense* は増殖しなかった。塩分15‰で増殖させた細胞を，10‰の培養液に接種した後に顕微鏡で観察したところ，寺田他（1987）が冬季の周防灘（水温3.5～3.8℃）や培養（水温 4 ℃）で観察したような球形あるいは風船状の突出物を持った異常形態を呈した。これは低塩分による異常と考えられる。一方，沼口・平山（1972）は大村湾産株が塩素量7.38‰（塩分13.3‰に相当）では増殖しなかったと報告している。以上のことから *G. nagasakiense* の最低塩分限界は10～15‰の間にあるものと考えられる。しかし，熊野灘に出現した *G. nagasakiense* は10‰以下の塩分濃度の水域でも細胞数で10^3 cells ml^{-1}程度存在することが報告されており(水産庁他 1986)，*G. nagasakiense* の低塩分耐性が株間によって異なる可能性も考えられる。

赤潮による漁業被害を防止するためには *G. nagasakiense* がいつ，どこで被害を及ぼす程高い細胞密度にまで増殖するかを的確に予測することが望ましい。このためにはその増殖や生存を支配する物理的，化学的及び生物的要因の影響を数量的に把握する必要がある。先の分散分析の結果，水温と塩分の相互作用が有意であること（Table 4-1），そして各水準が等間隔でとられていることから，増殖速度に及ぼす水温と塩分の関係を数量的に表すために多項式の当てはめを行った。モデルとしては一般に次の式が考えられる；

$$\mu=\beta_{00}+\beta_{10}\cdot T+\beta_{20}\cdot T^2+\beta_{30}\cdot T^3+\beta_{01}\cdot S+\beta_{02}\cdot S^2+\beta_{03}\cdot S^3+\beta_{11}\cdot T\cdot S$$
$$+\beta_{12}\cdot T\cdot S^2+\beta_{21}\cdot T^2\cdot S+\cdots+\beta_{nn}\cdot T^n\cdot S^n+\varepsilon$$

ここでμは増殖速度 (divisions day^{-1})，Tは水温 (℃)，Sは塩分 (‰)，β_{nn}は偏回帰係数，εは誤差項をそれぞれ示す。ここでは3次までをとり変数増減法による重回帰分析によって偏回帰係数を求めた (田中他 1984)。その結果，次に示す項が有意で残り，重回帰式が求まった。

$$\mu = 1.05753 - 0.30220 \cdot T + 0.01777 \cdot T^2 - 0.00035 \cdot T^3 + 0.00515 \cdot T \cdot S - 0.00010 \cdot T \cdot S^2$$

また重回帰係数は0.94であった。したがって，この式により，光条件及び栄養塩が制限要因になっていない条件下での増殖速度の予測が行えると考えられる。

第2節　競合赤潮ラフィド藻 *Chattonella* spp. の増殖生理

海産ラフィド藻 *C. antiqua* と *C. marina* は，大規模な赤潮を形成し養殖魚類の大量斃死を引き起こす原因種として知られている。1972年夏季に播磨灘で発生した *C. antiqua* の赤潮は，1,400万尾に上る養殖ハマチの大量斃死をもたらし大きな社会問題となった(水産庁瀬戸内海漁業調整事務局 1973)。以来 *Chattonella* (本節では *C. antiqua* と *C. marina* の2種を指すこととする) の赤潮の発生機構を解明するために，精力的な研究が行われてきた。特に生活史に関しては，*Chattonella* が冬季をシストの状態で海底泥中で過ごし，それらが翌年の赤潮のシードポピュレーションとして重要な役割を果たしていることが明らかにされている (IMAI and ITOH 1987，NAKAMURA *et al.* 1990)。一方，栄養細胞に関しても，物理・化学的な要因に対する増殖生理についての知見が蓄積されてきている (NAKAMURA and WATANABE 1983a,b)。しかしそれらのほとんどは単一要因に対する増殖応答の研究にとどまり，要因間の相互作用を取り扱ったものは *C. marina* に関する報告 (野沢 1984) のみである。また同一条件下で *C. antiqua* と *C. marina* の増殖生理を比較検討した研究報告は見当たらない。さらに，今井 (1990) は周防灘において *G. nagasakiense* と *Chattonella* との卓越の関係から，両者の間に競合関係の存在を示唆している。そこで本節においては，2種の *Chattonella* の無菌培養株を用いてそれらの増殖速度に及ぼす水温，塩分及び光強度の影響を調べ，さらにはそれら要因間の相互作用も併せて検討した。それらの結果に基づき *G. nagasakiense* と *Chattonella* との生理・生態特性の差異について考察した。

材料及び方法

1. 供試株と培地

実験に用いた *C. antiqua* (OC-B5) と *C. marina* (MS-3P) のうち，前者は1985年に大阪湾から分離しミクロピペット洗浄法 (岩崎　1967) により無菌化したクローン株である。*C. marina* は南西海区水産研究所今井一郎博士が1985年に周防灘から同様にして分離した無菌株を分譲されたものである。継代培養及び実験には，栄養強化培地である改変 SWM-3培地 (CHEN *et al.* 1969，伊藤・今井 1987) を使用した。

2.増殖速度に及ぼす光強度の影響

光強度120 μE $m^{-2}s^{-1}$で前培養を行った上記2種の *Chattonella* を，塩分31.3‰のSWM-3培地100 m*l* を分注した200 m*l* 容の三角フラスコ各々10本に約50 cells ml^{-1}の濃度になるように接種し，温度25℃，光強度は10 μE $m^{-2}s^{-1}$から190 μE $m^{-2}s^{-1}$までの10段階で培養を行った。光源には白色蛍光灯を用い，明暗周期は12hL：12hDに設定した。培養開始から1日間隔で検鏡による細胞数の計数を行い，第1節と同じく最小自乗法により増殖速度（divisions day^{-1}）を計算した。増殖速度と光強度の関係には第1節の(2)式に示す直角双曲線モデルを適用した。モデルへのあてはめは，前節と同様シンプレックス法による逐次計算によって行った。

3.in vivo クロロフィル蛍光による増殖速度の測定

改変SWM-3培地500 m*l* を分注した2本の三角フラスコに2種の *Chattonella* を各々接種し，温度25℃，光強度130 μE $m^{-2}s^{-1}$，12hL：12hDの明暗周期で培養を行った。1日間隔で培養液20 m*l* を採取し，検鏡による細胞数及びin vivo クロロフィル蛍光の測定を行い培養日数に伴う両者の関係を調べた。蛍光値は蛍光光度計（TURNER DESIGNS 社製 model 110）で測定した。

4.増殖に及ぼす水温と塩分の影響

増殖に及ぼす水温と塩分の影響は前節と同じく2因子要因計画実験によって調べた。培養実験温度は，10，15，20，25，30℃の5段階に設定した。またSWM-3培地の塩分濃度は，10，15，20，25，30，35‰の6段階に調整した。30‰以下の塩分は基本海水を超純水により希釈して，また35‰の濃度を得るためには，海水を50℃の恒温槽中で濃縮して調製した。このようにして塩分濃度を設定した後に培地成分を添加し培養液を調製した。培養実験は上記の水温と塩分のすべての組合せ，すなわち30通りについて実施した。

保存株を実験条件に馴致させるため以下の操作を行った。まず温度については，保存株の培養温度である22℃から少しづつ温度を上昇あるいは下降させながら，実験温度条件に馴致させた。次に各温度で増殖した細胞を6段階の塩分濃度の培地に接種した。それぞれの実験条件下で少なくとも一ヵ月間継代培養したものを前培養とした。本培養は，培地4 m*l* を分注したPPキャップ試験管（13×120 mm）に適宜希釈した前培養を1 m*l* 接種し（3本立て），光強度120 μE $m^{-2}s^{-1}$，明暗周期12hL：12hDで前培養と同じ温度で行った。接種細胞密度は，約50 cells ml^{-1}に調整した。培養開始後1日おきにin vivo クロロフィル蛍光を測定し，その結果から先の光強度の実験と同様の方法で増殖速度を求めた。

結　果

1.増殖速度に及ぼす光強度の影響

C. antiqua の増殖速度と光強度との関係をFig. 4-6に示す。本種は10 μE $m^{-2}s^{-1}$では増殖できなかった。増殖は光強度30 μE $m^{-2}s^{-1}$以上で認められ，110 μE $m^{-2}s^{-1}$以上ではほぼ1.0 division day^{-1}の増殖速度で飽和した。逐次計算によって得られたμ_mは1.34 divisions day^{-1}，K_sは42.35 μE $m^{-2}s^{-1}$，I_0は10.31 μE $m^{-2}s^{-1}$であった。この結果に基づき，増殖速度と光強度の関係はFig.

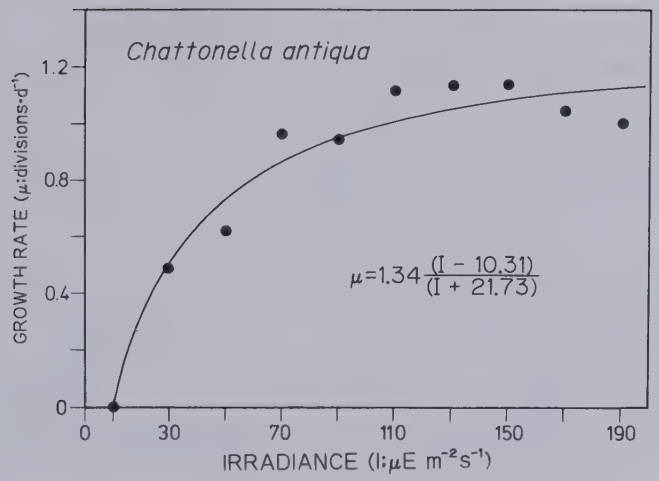


Fig.4-6. The effect of light intensity (I) on the growth rate of *C. antiqua* (μ). Rectangular hyperbola equation in the figure was fitted by simplex minimization procedure.

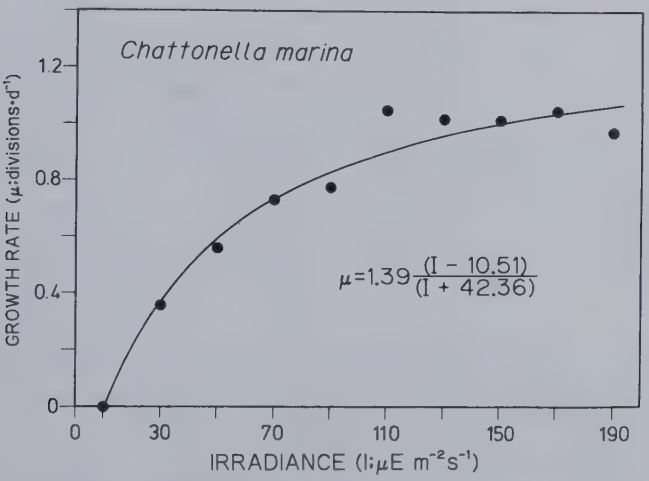


Fig.4-7. The effect of light intensity (I) on the growth rate of *C. marina* (μ). Refer to Fig. 4-6 for other legends.

4-6中の式で表すことができた。

C. marina の増殖速度と光強度の関係を Fig. 4-7 に示す。本種は *C. antiqua* とほぼ同様の光強度と増殖速度の関係を示した。逐次計算により μ_m は1.39 divisions day^{-1}, K_s は63.38 μE m^{-2}s^{-1}, I_0は10.51 μE m^{-2}s^{-1}と計算された。この結果から増殖速度と光強度の関係は図中の計算式で表せた。*C. marina* における K_s は *C. antiqua* よりも約20 μE m^{-2}s^{-1}大きいことから，*C. marina* はより高い光強度を増殖に要求することが示唆された。

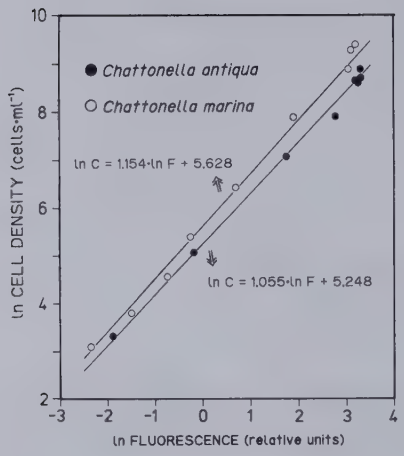


Fig.4-8. Relationship between cell density (C) and in vivo chlorophyll fluorescence (F) in *C. antiqua* and *C. marina*.

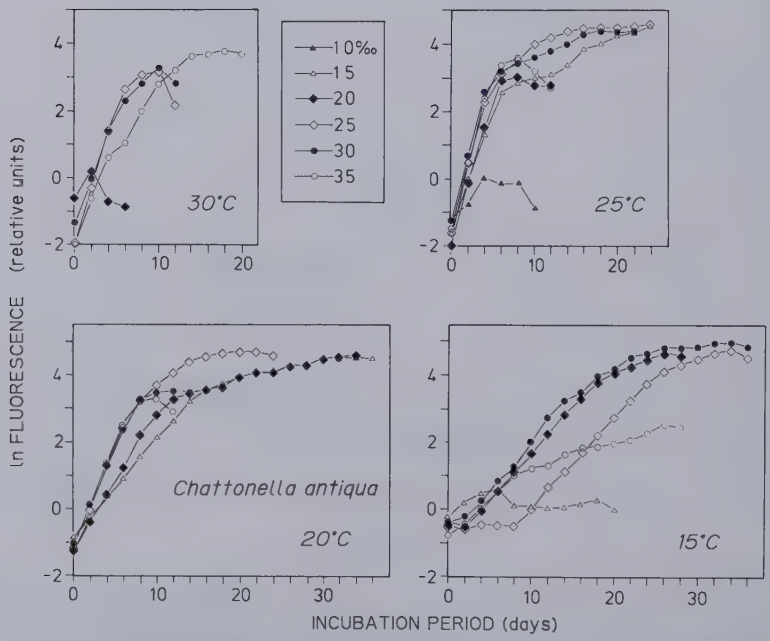


Fig.4-9. Growth curves of *C. antiqua* grown at various temperature and salinity combinations. Growth expressed as natural logarithm of in vivo fluorescence intensity averaged over three replicates.

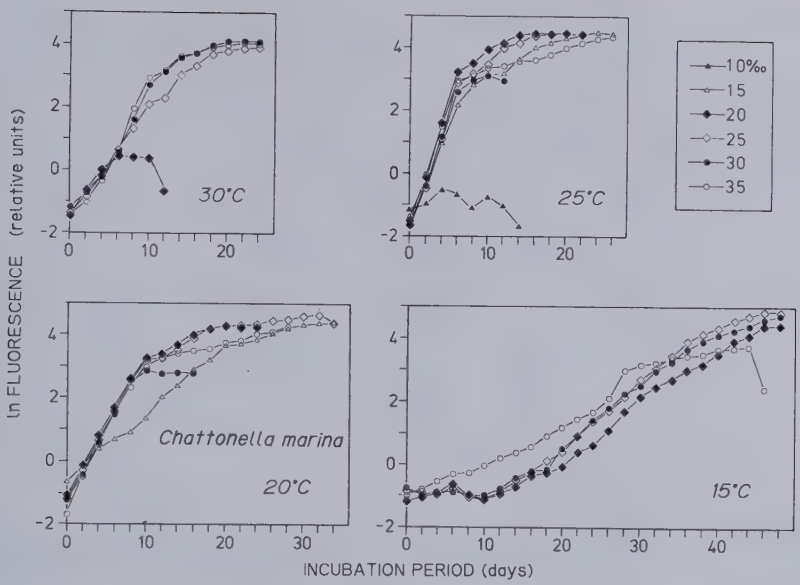


Fig.4-10. Growth curves of *C. marina* grown at various temperature and salinity combinations. Refer to Fig. 4-9 for other legends.

2. 増殖に及ぼす水温と塩分の影響

C. antiqua と *C. marina* の増殖に伴う細胞密度（C）と，in vivo クロロフィル蛍光（F）の関係をFig. 4-8に示す。両者の間には次式で示されるように高い相関関係が認められた。

C. antiqua

$$\ln C = 1.055 \ln F + 5.248 \quad (r^2 = 0.996)$$

C. marina

$$\ln C = 1.154 \ln F + 5.628 \quad (r^2 = 0.996)$$

このことから細胞数の代わりに蛍光値を測定することによって，増殖速度が計算できることが判明した。

種々の水温と塩分条件下で培養した *C. antiqua* の増殖曲線を Fig. 4-9に示す。本種は10℃では全く増殖不可能であった。またそれ以上の温度でも前培養において増殖が見られなかった実験区については本培養は行わず，増殖速度は 0 とした。水温30℃の場合，塩分20 ‰以上で増殖が観察されたが，20 ‰での最大収量は非常に低かった。25℃の場合，すべての塩分条件下で本種は増殖した。ただし，10 ‰での最大収量は低かった。20℃では15 ‰以上で増殖が見られたが，塩分の低下に従って増殖速度も低下した。15℃においては15 ‰以上で増殖が認められた。しかし，35 ‰と15 ‰では増殖速度及び最大収量は共に小さかった。

C. marina の増殖曲線を Fig. 4-10に示す。本種も *C. antiqua* と同様に10℃では増殖できなかった。30℃では，20 ‰以上で増殖が確認されたが，20 ‰での最大収量は低かった。25℃では

Table 4-2. Summary of two-way analysis of variance of the growth rate of *Chattonella* spp. as a function of temperature, salinity and their interaction.

Species	Source of variation	d.f.	Sum of squares	Mean square	F
C. antiqua	Temperature	4	6.207	1.552	1291.93***
	Salinity	5	2.348	0.470	391.02***
	Interaction	20	1.184	0.059	49.29***
	Error	60	0.072	0.001	
	Total	89	9.812		
C. marina	Temperature	4	4.229	1.057	1561.43***
	Salinity	5	1.566	0.313	462.40***
	Interaction	20	0.778	0.039	57.47***
	Error	60	0.041	0.001	
	Total	89	6.614		

*** significant at the 1% level.

すべての塩分条件下で増殖が見られた。しかし，10‰における最大収量は非常に小さかった。20℃においては，本種は15‰以上で増殖したが，15‰における増殖速度及び最大収量は共に小さかった。15℃の場合，20‰以上で増殖が観察された。ただし，35‰においても他の塩分と同程度に増殖できること，及び15‰では全く増殖できない点が *C. antiqua* と異なっていた。

以上の増殖曲線から計算された増殖速度を水温と塩分の2因子要因計画法によって解析した（Table 4-2）。その結果 *C. antiqua* と *C. marina* の両種とも水温，塩分の主効果及びそれらの相互作用が有意水準1％で有意であった。また両種とも総平方和のうち64％程度が水温によって占められていた。これにより水温が増殖速度に最も大きく影響していることが示唆された。

水温と塩分の組み合せに対する *C. antiqua* と *C. marina* の増殖速度を3次元的に示すとFig. 4 11とFig. 4-12のようになる。水温と塩分に対する増殖応答は両種ともほぼ同様のパターンを示した。温度の影響を見ると，25℃を境に低温側でなだらかに，高温側でやや急激に低下するといった微細藻類に典型的な温度応答（Eppley 1972）を示した。塩分について見ると，増殖の限界付近の低塩分で増殖速度は急激に低下するが，それ以上では変化は小さかった。最大増殖速度を与える水温と塩分の組合せは，*C. antiqua* では25℃と25‰であり（Fig. 4-11），一方 *C. marina* では25℃と20‰であった（Fig. 4-12）。そして最大値としてそれぞれ，0.97 divisions day^{-1}，0.81 divisions day^{-1}が得られた。

考　察

数値モデルを構築しシミュレーションによって赤潮の発生予知を行う場合，定式化に重要な要素は増殖速度である。したがって，増殖速度に対する種々の環境要因の影響を，それらの相互作用も含めて，定量的に把握する必要がある。水温，塩分及び光強度に対する *Chattonella* の増殖応答に関しては，池田（1971），岩崎（1971），Nakamura and Watanabe（1983a），野

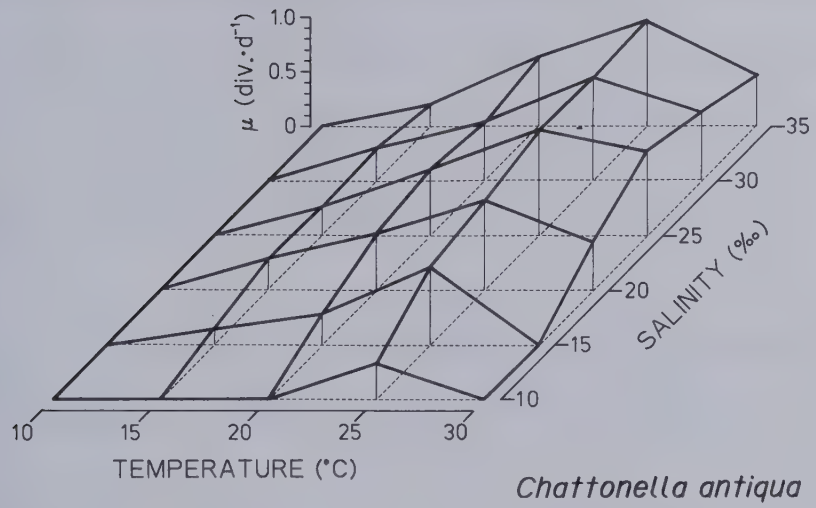


Fig.4-11. Multivariate response surface of the growth rate of *C. antiqua* as a function of temperature and salinity.

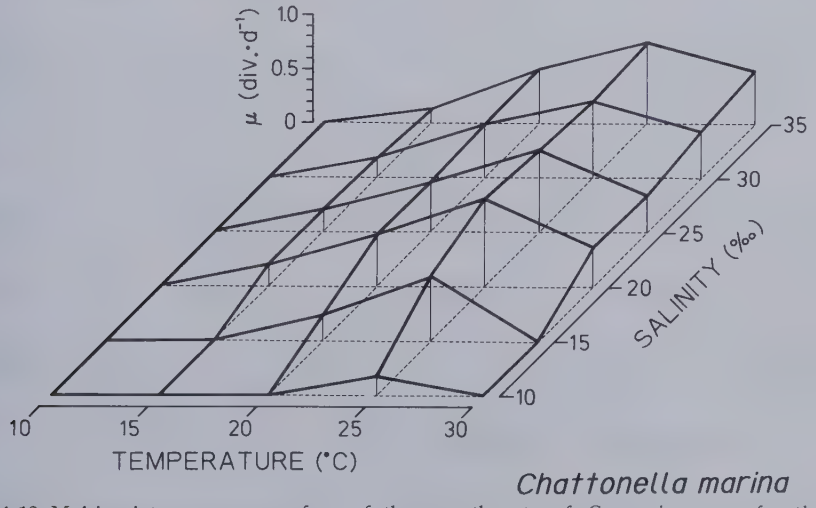


Fig.4-12. Multivariate response surface of the growth rate of *C. marina* as a function of temperature and salinity.

沢 (1984), 矢持 (1984) の報告がある。しかし野沢 (1984) の報告以外は単一要因に対する増殖応答しか調べられていない。また増殖を最大収量で検討している場合が多いが, 第 1 節の *G. nagasakiense* の例に示されるように, 最大収量を与える条件と最大増殖速度を与える条件とは必ずしも一致しない場合がある。以下の考察では, 本節で得られた結果に基づき *Chattonella* の増殖応答の特徴について論じ, *G. nagasakiense* のそれとの比較を行った。さらに増殖速度と水温・塩分との関係を定式化した。

C. antiqua と *C. marina* は共に光強度10 μE $m^{-2}s^{-1}$では増殖できず，また増殖速度が飽和する光強度は110 μE $m^{-2}s^{-1}$であった（Fig. 4-6とFig. 4-7）。また，*C. marina* は *C. antiqua* に比べ若干高い光強度を要求することが示された。播磨灘産の *C. antiqua* の増殖は0.011 ly min^{-1}以上で見られ，増殖速度は0.04 ly min^{-1}で飽和したと報告されている（NAKAMURA and WATANABE 1983a）。これらの光強度は，波長550 nm で換算すると（有賀・横浜 1979）それぞれ35及び128 μE $m^{-2}s^{-1}$に相当する。したがって，今回の実験結果は播磨灘株の結果にほぼ一致したと見なすことができよう。このことは，*Chattonella* の光に対する増殖応答は，株間にも種間にも，それほど差がないことを意味している。

周防灘においては，夏季に *Chattonella* が卓越する年と *G. nagasakiense* が卓越する年とがあり，*Chattonella* が卓越するためには豊富な日照時間が必要であることが示唆されている（今井 1990）。さらに大村湾や福岡湾でも低日射量の年に *G. nagasakiense* 赤潮が発生し易い傾向が認められている（飯塚 1989，山本他 1989）。本実験結果から弱光は *Chattonella* の増殖に不適であることが判明した（Fig. 4-6とFig. 4-7）。それに対して，*G. nagasakiense* は10 μE $m^{-2}s^{-1}$の低光強度下でも十分増殖が可能であった（前節 Fig. 4-1）。これらの実験結果は，現場海域における卓越種の交替過程に光強度に対する増殖応答の差が大きく影響することを裏付けるものである。

NAKAMURA and WATANABE（1983a）によれば，*C. antiqua* は水温15℃から28℃の範囲で増殖し，25℃で最大増殖速度を示したとされている。矢持（1984）は *C. antiqua* 及び *C. marina* の最大収量と温度との関係を調べ，*C. antiqua* の好適温度は20～30℃で，11℃では全く増殖しないこと，*C. marina* は21～30℃で良好に増殖するが，13℃では増殖せず，低温に敏感であることを報告している。彼はさらに，両種の間には13～17℃の間で応答に差が見られ，*C. antiqua* の方が高い収量を示したと述べている。野沢（1984）は，鹿児島湾産の *C. marina* の増殖が，17.5～27.5℃の温度範囲で見られ，その適温は22.5℃であることを報告している。水温に関するこれらの知見は，2種の *Chattonella* の増殖可能水温が広範囲にわたることを示している。本研究で得られた結果は，上記の報告よりさらに広い温度範囲で *Chattonella* の増殖が可能であることを示した。すなわち，水温15～30℃が *Chattonella* の増殖可能範囲と考えて良さそうである。しかも増殖速度は温度の変化に最も敏感に応答することが判明した（Table 4-2）。

C. antiqua 及び *C. marina* の最大増殖速度を与える温度は共に25℃付近にあることが明らかとなった。IWASAKI（1979）によれば，25℃以上に増殖の最適水温（ただし増殖速度と最大収量の両者を含む）を有する植物プランクトン種は少ない。したがって，このように高い最適水温を有することは *Chattonella* が夏季に生息場を優占できる重要な要因であると言えよう。しかし，*Chattonella* の増殖最適温度は *G. nagasakiense* のそれとほぼ一致することから，温度がこれら両種の交替要因になっているとは考えにくい。

Chattonella は10℃では全く増殖不可能であった（Figs. 4-11と4-12）。この実験結果は，冬季に水温が7℃付近まで低下する瀬戸内海（小村 1983）において *Chattonella* が栄養細胞のままでは越冬できないことを示している。そのため *Chattonella* はシストの状態で越冬するが，シ

ストの成熟には11℃以下の低温を必要とし（IMAI and ITOH 1987），さらにその発芽の最適水温は22℃であると報告されている（今井他 1984）。このようなシストの生理及びここで明らかになった栄養細胞の温度応答を考慮すると，*Chattonella* は瀬戸内海の温度環境に極めて良く適応している生物と言える。一方，鹿児島湾においては，冬季の水温が14～15℃であり（久万田他 1987），増殖可能な水温範囲の下限付近に相当する。そのため栄養細胞の状態で越冬できる可能性がある。本研究で得られた *Chattonella* の温度特性は，現場におけるそれらの出現状況（吉松・小野 1986，HONJO 1987）や，赤潮発生時の水温（田中他 1977，寺田他 1982，高山 1983）とも良く一致している。

以上のような *Chattonella* の低温度耐性は，前節の *G. nagasakiense* のそれと大きく異なる。前述のように，*Chattonella* はシストという越冬手段を用いることによって瀬戸内海の水温環境に適応している。シストの機能としては，このような栄養細胞の生存不適環境に対する耐性以外にも，赤潮の発生源，種の分布拡大，有性生殖による遺伝的多様性の維持等が挙げられる（WALL 1971，1975）。しかしシストはこのような生き残り戦略上の利点を有する反面，その成熟や発芽のために一定の環境条件を必要とする（ANDERSON and MOREL 1979，ANDERSON 1980）など，不都合な点も有する。例えば *Chattonella* のシストはその成熟に低温を必要とするし，さらに成熟が完了しても発芽に適当な温度条件が整うまで強制休眠を余儀なくされる（今井他 1984，IMAI and ITOH 1987）。さらに渦鞭毛藻のシストは多くが有性生殖の結果形成されるが（DALE 1983），有性生殖が誘導されるためにも一定の条件（光，温度，栄養塩等）が満たされる必要がある（VON STOSCH 1973，PFIESTER 1975,1976,1977，SAKO *et al.* 1984，1985，1987）。これに対して，栄養細胞は休眠や発芽といった段階を経ずとも好適条件下では直ちに増殖を開始し，個体群の増大を図ることが可能である。したがって，生活史上にシストを有することが必ずしも種の生存戦略として有利であるとは言えないように思われる。このことは数千種といわれる現生の渦鞭毛藻の中で，シストの存在が知られている種がたかだか58種であるという事実（福代 1987b）とも良く符合する。ただしシストを持たない場合には栄養細胞の増殖可能な環境条件の幅が広く，大きな増殖速度を持つことが個体群の維持に必要となる（中原・左子 1987）。前節で述べたように，*G. nagasakiense* の場合は特に温度に対する耐性限界の幅を広くすることによって栄養細胞で周年存在し，個体群の維持・拡大を図っているものと考えられる。

岩崎（1971）は *Eutreptiella* sp.（＝*C. antiqua*）の最大収量と塩分の関係を調べ，本種がCl 10‰（塩分18.1‰）付近で最も良く増殖し，好適塩分範囲はCl 8～17‰（塩分14.4～30.7‰）であると述べている。また池田（1971）も *C. antiqua* の好適塩分はCl 9～17‰（塩分 16.3～30.7‰）で，Cl 4.6‰（塩分8.3‰）では増殖しないと報告している。さらに，NAKAMURA and WATANABE（1983a）は，25～41‰の塩分範囲で *C. antiqua* の増殖速度が一定であったと述べている。一方，鹿児島湾産の *C. marina* は15.5～30.1‰で高い細胞密度に増殖することが報告されている（野沢 1984）。本研究結果によれば，最大増殖速度を示す25℃における2種の *Chattonella* の増殖は10から35‰と，極めて広い塩分範囲にわたって観察された。以上の

Table 4-3. Cubic regression equations for predicting the growth rate of *Chattonella* spp..

	Estimated regression coefficients	
	C. antiqua	*C. marina*
T	-1.49979	-1.21833
T^2	0.07380	0.05924
T^3	-0.00117	-0.00092
S^2	ns	-0.00157
S^3	-0.00001	ns
TS	0.00389	0.00669
TS^2	-0.00003	0.00001
T^2S	-0.00003	-0.00015
Constant	9.34751	7.43755
Adjusted R^2	0.93	0.92

ns: not significant at the 5% level.

結果を総合すると，*C. antiqua* も *C. marina* も広塩分性種であると判断される。ただし，増殖可能な塩分範囲は温度によって影響を受けることに留意する必要がある。

Chattonella 赤潮は，降雨による塩分低下時と（田中他 1977，寺田他 1981，寺田他 1982），1984年の周防灘（寺田・神薗 1986）や1987年の播磨灘（水産庁瀬戸内海漁業調整事務所 1988）のように塩分が高い場合，の両方で発生が確認されている。このような現場観察は，*Chattonella* が広い塩分範囲で高い増殖速度を維持できるといった生理特性によって良く説明できよう。

赤潮による漁業被害を未然に防止するためには，*Chattonella* の増殖を的確に予測することが望まれる。先の分散分析の結果，水温と塩分の相互作用が有意であること（Table 4 2），そして各水準が等間隔に設定されていることから，第IV章第1節と同様の多項式モデルによる増殖速度と水温及び塩分の関係の定式化を行った。その結果 Table 4-3 に示す項が有意で残り，重回帰式が求まった。光強度や栄養塩濃度が制限的でない場合には，本多項式によって増殖速度を予測できると考えられる。

これまで述べたように，*Chattonella* の増殖には水温と塩分の2因子間でも相互作用が有意であった。また，前節で述べたように *G. nagasakiense* でも同様の結果が得られている。これらの結果は，赤潮原因プランクトンの個体群動態と環境との関係を論ずる際に，要因相互の関係が無視できないことを強く示唆している。このような相互作用は，水温と塩分以外にも，光条件（Jitts *et al.* 1964，Smayda 1969）や栄養塩（Rhee and Gotham 1981）の間にも存在することが報告されている。今後は実験計画法的手法を駆使することにより，増殖に及ぼすより多くの要因をそれらの相互作用も含めて解析して行く必要があろう。

第3節　珪藻類の増殖生理

温帯域においては植物プランクトン種組成の季節遷移に一定のパターンが見られることが知られている。すなわち，春先には珪藻類のブルームが起こり，それに続いて晩春から初秋にかけては鞭毛藻類（渦鞭毛藻やラフィド藻等）が卓越するが，それ以降は再び珪藻類が優先する（DURBIN *et al.* 1975, NAKAHARA 1978）。SMAYDA（1980）はこのような季節遷移の要因を他発的（allogenic）と自発的（autogenic）要因の二つに大別しており，前者には水温，塩分，光強度等が，また後者には生活史，栄養塩，捕食等が含まれるとしている。本節では主な珪藻類の増殖に及ぼす水温と塩分の影響を前節（第1，2節）と同様の手法で明らかにし，*G. nagasakiense* の増殖生理との比較を行った。

材料及び方法

1. 供試株と培地

実験に用いた珪藻類は1989年3月に広島湾より分離し，マイクロピペット洗浄法（岩崎 1967）によって無菌化した4種，*Chaetoceros didymum* var. *protuberans, Ditylum brightwellii, Skeletonema costatum, Thalassiosira* sp. のクローン株である。継代培養及び以下の実験には改変SWM-3培地（CHEN *et al.* 1969, 伊藤・今井 1987）を用いた。

2. in vivo クロロフィル蛍光による増殖速度の測定

SWM-3培地500 m*l*を分注した1 liter容の三角フラスコに上記4種の珪藻を接種し，15℃，光強度120 μE $m^{-2}s^{-1}$（明暗周期12hL:12hD）の条件下で培養した。その後毎日培養20 m*l* を採取し，細胞数及び in vivo クロロフィル蛍光の測定を行い，培養日数に伴う両者の変化を調べた。

3. 増殖に及ぼす水温と塩分の影響

増殖に及ぼす水温と塩分の影響は前節と同様2因子要因計画によって調べた。4種の珪藻を水温5段階（10～30℃），塩分6段階（10～35 ‰）のすべての組合せ（30通り）の条件に馴致させるため，それらの水温条件で少なくとも一ヵ月，その後種々の塩分条件で少なくとも2週間継代培養を行ったものを前培養とした。それぞれの実験条件で増殖が見られた培養を，SWM-3培地4 m*l* を分注したPPキャップ試験管（3本立て）に接種し，前培養と同じ条件下で本培養を開始した。光強度は120 μE $m^{-2}s^{-1}$（明暗周期12hL:12hD）とした。培養開始後毎日 in vivo クロロフィル蛍光の測定を行い，その変化から前節と同様最小自乗法によって増殖速度（divisions day^{-1}）を計算した。

結　果

1. 珪藻類の増殖速度測定法

培養日数の経過に伴う細胞数（C）と in vivo クロロフィル蛍光（F）の関係をFig. 4-13に示す。4種とも両者の間には次式で示される明瞭な直線関係が得られた。

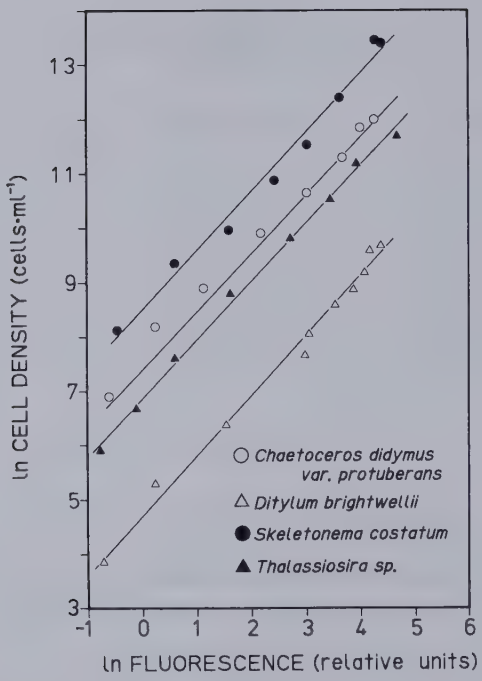


Fig. 4-13. Relationship between cell density and in vivo chlorophyll fluorescence in four species of diatom.

C. didymum var. *protuberans*

$$\ln C = 1.002 \ln F + 7.699 \quad (r^2=0.994)$$

D. brightwellii

$$\ln C = 1.096 \ln F + 4.729 \quad (r^2=0.990)$$

S. costatum

$$\ln C = 1.087 \ln F + 8.482 \quad (r^2=0.986)$$

Thalassiosira sp.

$$\ln C = 1.076 \ln F + 6.837 \quad (r^2=0.997)$$

以上の結果から，細胞数の代わりに in vivo クロロフィル蛍光を用いて増殖速度が測定可能であることが分かった。

2. 増殖に及ぼす水温と塩分の影響

種々の水温と塩分の組合せ条件下で培養した4種の珪藻類の増殖曲線をFigs. 4-14～4-17に示した。

まず *C. didymum* var. *protuberans* の結果であるが，本種は10℃から25℃の範囲で増殖した。しかし，30℃では全く増殖が見られなかった。増殖が可能な塩分範囲は温度によって異な

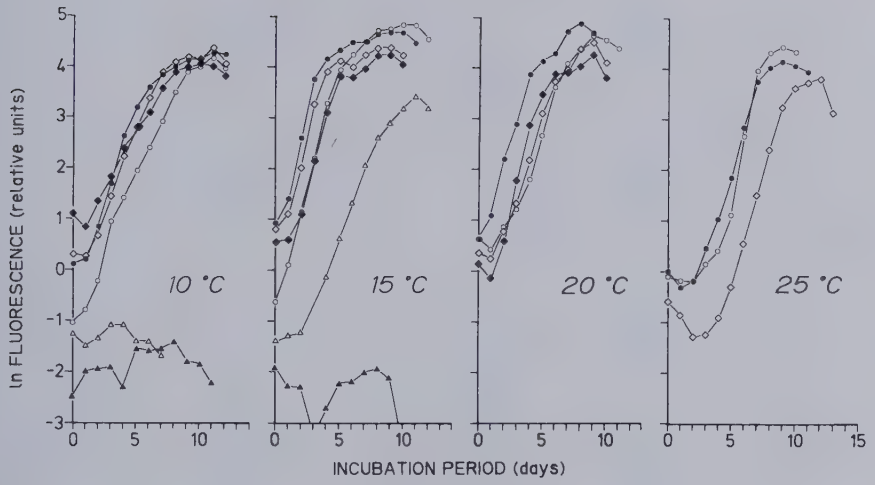


Fig.4-14. Growth curves of *C. didymum* var. *protuberans* grown under various temperature and salinity combinations. Growth expressed as natural logarithm of in vivo fluorescence intensity averaged over three replicates. Symbols; −▲−,10 ‰ ; −△−,15 ‰ ; −◆−,20 ‰ ; −◇−,25 ‰ ; −●−,30 ‰ ; −○−,35 ‰.

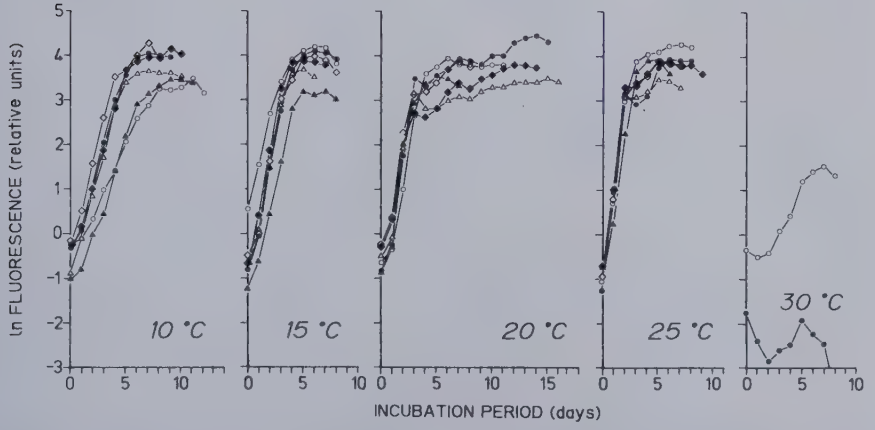


Fig.4-15. Growth curves of *D. brightwellii* grown under various temperature and salinity combinations. Refer to Fig. 4-14 for other legends. Symbols; −▲−,10 ‰ ; −△−,15 ‰ ; −◆−,20 ‰ ; −◇−,25 ‰ ; −●−,30 ‰ ; −○−,35 ‰.

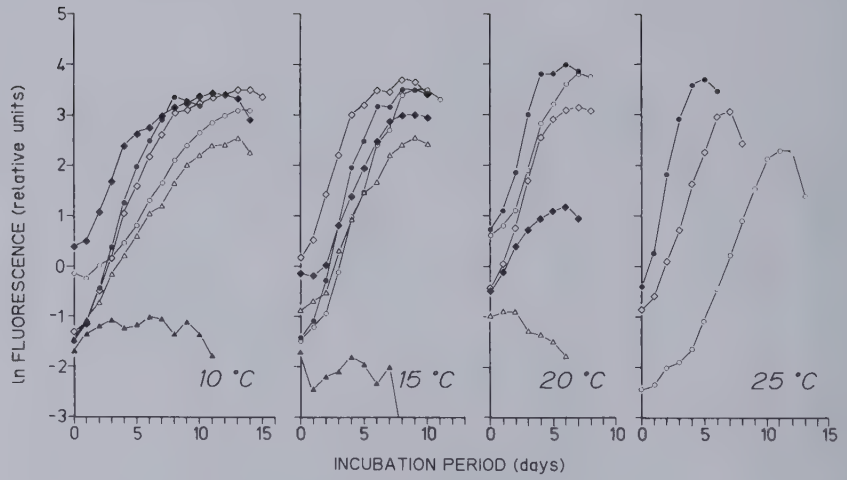


Fig.4-16. Growth curves of *S. costatum* grown under various temperature and salinity combinations. Refer to Fig. 4-14 for other legends. Symbols; −▲−, 10 ‰ ; −△−, 15 ‰ ; −◆−, 20 ‰ ; −◇−, 25 ‰ ; −● , 30 ‰ ; −○−, 35 ‰.

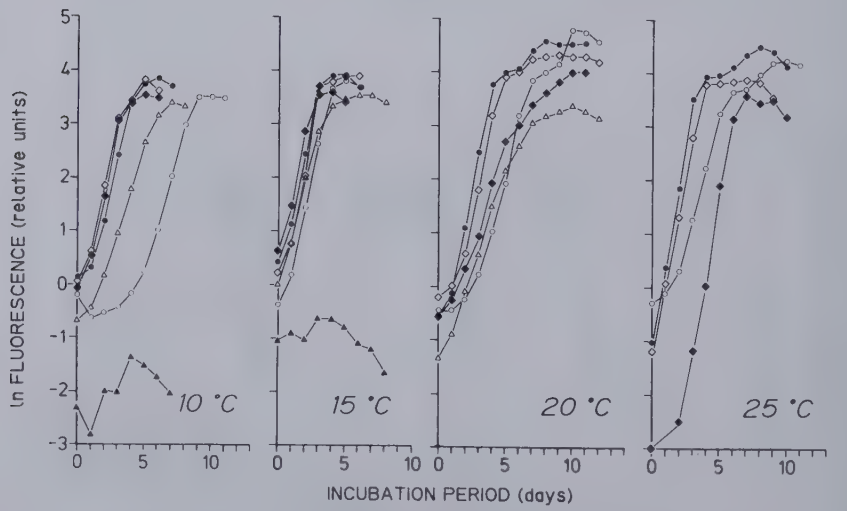


Fig.4-17. Growth curves of *Thalassiosira* sp. grown under various temperature and salinity combinations. Refer to Fig. 4-14 for other legends. Symbols; −▲−, 10 ‰ ; −△−, 15 ‰ ; −◆−, 20 ‰ ; −◇−, 25 ‰ ; −●−, 30 ‰ ; −○−, 35 ‰.

Table 4-4. Summary of two-way analysis of variance of the growth rate of four species of diatom as a function of temperature, salinity and their interaction.

Species	Source of variation	d.f.	Sum of squares	Mean square	F
C. didymum	Temperature	4	15.644	3.911	356.61***
	Salinity	5	16.110	3.222	293.80***
	Interaction	20	12.216	0.611	55.69***
	Error	60	0.658	0.011	
	Total	89	44.628		
D. brightwellii	Temperature	4	73.162	18.291	465.33***
	Salinity	5	2.131	0.426	10.84***
	Interaction	20	3.856	0.193	4.90***
	Error	60	2.358	0.039	
	Total	89	81.507		
S. costatum	Temperature	4	9.687	2.422	352.20***
	Salinity	5	11.389	2.278	331.25***
	Interaction	20	7.007	0.350	50.96***
	Error	60	0.413	0.007	
	Total	89	28.494		
Thalassiosira sp.	Temperature	4	26.900	6.725	443.61***
	Salinity	5	21.452	4.290	283.01***
	Interaction	20	11.731	0.587	38.69***
	Error	60	0.910	0.015	
	Total	89	60.992		

*** Significant at the 1% level.

り，特に高温側でその範囲が小さくなった。すなわち，25℃では20‰以下で，20℃では15‰以下の低塩分で増殖が見られなかった。一方，15℃ではすべての塩分（10～35‰）で増殖が見られたが，10‰での最大収量は非常に小さく，このような低塩分での最大収量の低下は10℃における15‰以下の低塩分でも同様にみられた（Fig. 4-14）

次に *D. brightwellii* の増殖曲線を Fig. 4-15に示す。本種は10℃から30℃のすべての温度で増殖が見られた。また25℃以下の温度では10‰から35‰のすべての塩分で増殖が可能であった。ただし，30℃では25‰以下の塩分で増殖できず，さらに30‰以上の塩分での最大収量も小さいなど，高温における増殖可能塩分範囲は減少した。

S. costatum の増殖曲線を Fig. 4-16に示す。本種は30℃では全く増殖できなかった。また温度によって増殖可能塩分範囲が異なり，25℃では20‰以下の塩分で，また20℃では10‰で増殖が起こらないなど，高温では増殖可能な塩分範囲が減少した。一方，15℃以下の温度では10‰での最大収量がかなり小さかった。

Thalassiosira sp. の増殖曲線をFig. 4-17に示す。本種も30℃では増殖できず，また25℃では15‰以下，20℃では10‰以下の塩分で増殖不能であった。15℃以下では10‰での最大収量が小さかった。

以上の増殖曲線から増殖速度を求め，水温と塩分の組み合せに対する応答曲面として3次元

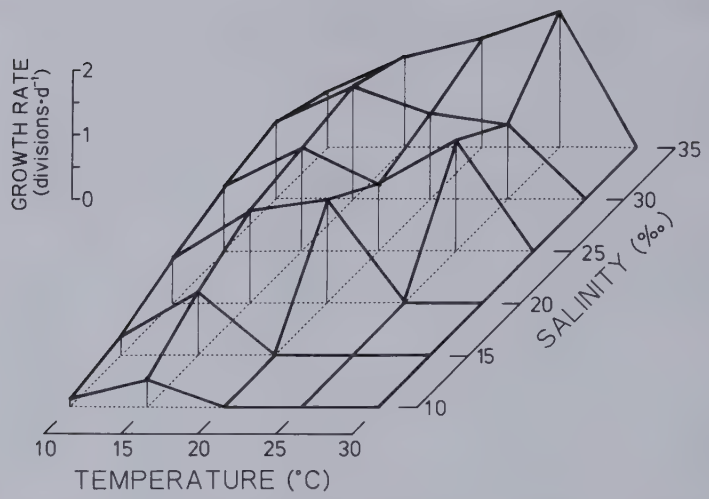


Fig.4-18. Multivariate response surface of the growth rate of *C. didymum* var. *protuberans* as a function of temperature and salinity.

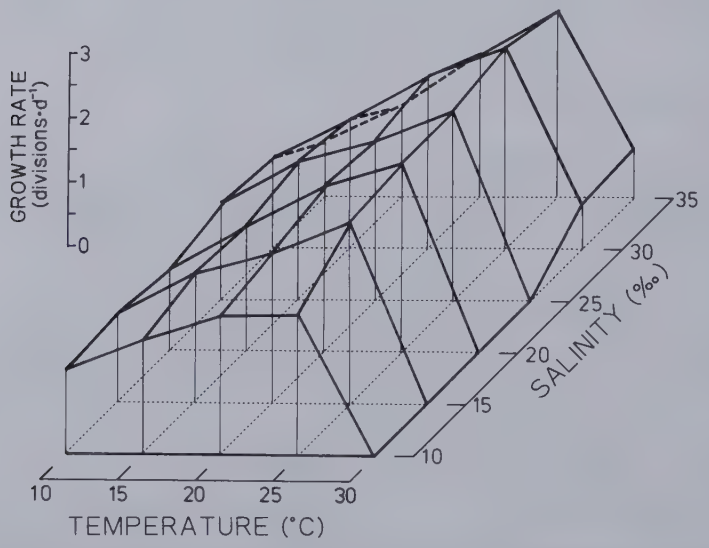


Fig.4-19. Multivariate response surface of the growth rate of *D. brightwellii* as a function of temperature and salinity.

的に表した（Figs. 4 18～4 21）。さらにそれらの関係を2因子要因計画で解析した結果をTable 4-4に示した。*C. didymum* var. *protuberans* では，25℃を上限として高温・高塩分ほど増殖速度が大きくなる傾向が見られた。最大増殖速度を与える水温と塩分の組み合せは

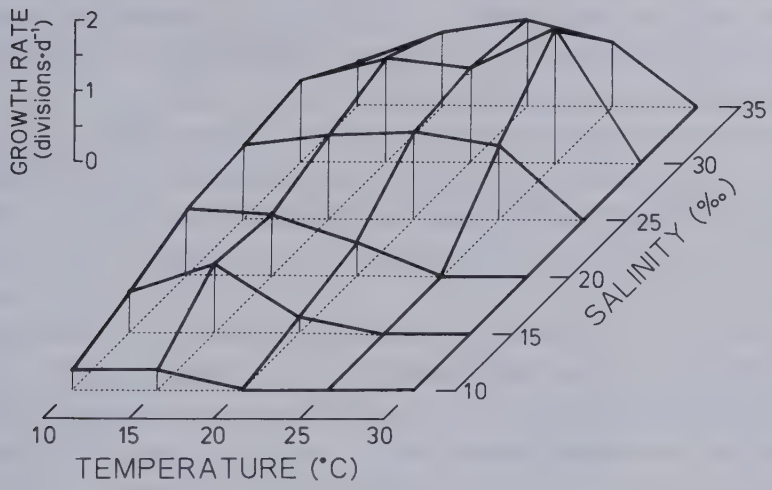


Fig.4-20. Multivariate response surface of the growth rate of *S. costatum* as a function of temperature and salinity.

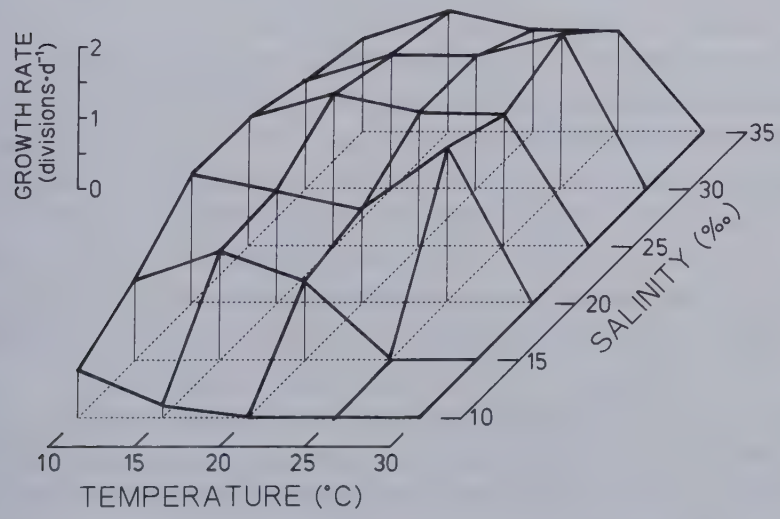


Fig.4-21. Multivariate response surface of the growth rate of *Thalassiosira* sp. as a function of temperature and salinity.

25℃, 35‰で, 最大値 2.1 divisions day $^{-1}$が得られた(Fig. 4-18)。分散分析の結果, 水温と塩分の主効果及び交互作用が有意であり, 平均平方で見た場合, 水温と塩分の効果はほぼ等しかった (Table 4-4)。

D. brightwellii では25℃を上限として温度の上昇とともに増殖速度が増大した。しかし同一温度内では塩分による増殖速度の差はほとんど見られなかった。最大増殖速度を与える水温と

塩分の組み合せは25℃, 30 ‰であり, 最大値として3.1 divisions day $^{-1}$が得られた(Fig. 4-19)。分散分析の結果, 水温と塩分の主効果及び交互作用が有意であった (Table 4-4)。また総平方和のうち90%が水温で占められており, 本種の増殖速度の変動はほぼ水温のみで説明できることが判明した。

S. costatum では25℃, 30 ‰を上限として高温・高塩分ほど増殖速度が増大するといった, *C. didymum* var. *protuberans* とほぼ同様の傾向が見られた。最大増殖速度を与える水温と塩分の組み合せは25℃, 30 ‰で, 1.9 divisions day $^{-1}$の増殖速度が得られた (Fig. 4-20)。分散分析の結果, 水温と塩分の主効果及び交互作用が有意であり, 水温と塩分の効果はほぼ等しかった (Table 4-4)。

Thalassiosira sp. は *C. didymum* var. *protuberans* 及び *S. costatum* と, *D. brightwellii* との中間的な傾向を示した。すなわち低温あるいは低塩分における増殖速度があまり低下せず, 比較的広範囲の水温・塩分の組み合せ条件下で高い増殖速度が維持された(Fig. 4-21)。最大増殖速度を与える水温と塩分の組み合せは25℃, 30 ‰で, 最大2.2 divisions day $^{-1}$が得られた。分散分析の結果, 水温と塩分の主効果及び交互作用が有意であった。水温の効果の方が塩分よりやや大きかった (Table 4-4)。

考　察

現場海域における植物プランクトンの出現には明瞭な季節変化が見られることが知られており (IGNATIADES and SMAYDA 1970, NAKAHARA 1978), 季節遷移と呼ばれている。そのような季節性をもたらす環境要因としては, 光 (HITCHCOCK and SMAYDA 1977), 水温 (SMAYDA 1973), 塩分 (QASIM *et al.* 1972) 等の物理的な要因のみならず, 多数の環境因子が挙げられている (SMAYDA 1980)。このように植物プランクトン種の遷移は極めて複雑な生態現象であるため (GUILLARD and KILHAM 1977), 本研究結果のみから遷移機構について論ずることは困難であると考えられる。したがって, ここでは珪藻類の水温と塩分に対する増殖特性に基づいて出現の季節性について論じ, 浦ノ内湾で観察された *G. nagasakiense* と珪藻類との出現時期の違い (前章Fig. 3-17) について考察を試みる。

本研究の結果, 4種の珪藻類は温度10～25℃, 塩分10～35 ‰で増殖が可能であったことから広温・広塩分性であると判断される。またそれらの好適水温及び塩分はこれまでの研究結果とほぼ一致した (TAKANO 1963, JITTS *et al.* 1964, EPPLEY 1977, SHIMURA *et al.* 1979)。ただし好適環境条件を論じる際に, 水温によって増殖可能な塩分範囲が変化するといった要因間の相互作用が存在することに留意する必要がある。

ほとんどの珪藻類の場合, 最大増殖速度は25℃で観察されたが, 増殖可能塩分範囲が最も広い温度は15℃で, 両者の間には10℃もの差が見られた (Figs. 4-18～4-21)。したがって, 増殖可能塩分範囲から見た場合, 好適水温は15～20℃にあるとも言える。第III章で述べたように, この水温は浦ノ内湾における珪藻類の増殖盛期とほぼ一致している(Fig. 3-17)。しかし, 第1節及び2節で述べた *G. nagasakiense* や *Chattonella* の場合には, 最大増殖速度を与える温度と

増殖可能な塩分範囲が最も広い温度とは一致しており，この点は珪藻類と大きく異なるところである。ところで，珪藻類 *Detonula confervacea, T. nordenskioeldii* や *S. costatum* では，現場海域で高密度に出現する水温が実験条件下で得られたそれらの増殖最適水温よりもかなり低いことが知られている（JITTS *et al.* 1964，SMAYDA 1969，1980）。本研究で明らかになったように要因間に相互作用があることを考慮すると，現場海域では水温以外の環境因子が増殖の制限要因になっており，その結果このような相違がもたらされた可能性が考えられる。したがって，SMAYDA (1980) も指摘しているように，温度のみが種の遷移機構を制御するのではなく，他の要因あるいはそれらの組み合せが遷移過程に影響を及ぼしているのであろう。

YODER (1979) は *S. costatum* のクローン株が広範囲の温度で増殖できることから，冬～春季の増殖と夏～秋季のそれとは同一のシードポピュレーションから始まっていると考えた。それに対して GALLAGHER (1980) は *S. costatum* の冬季群は夏季群と遺伝的に異なることを示し，単一クローン株は個体群すべてを代表しているとは言えず，集団遺伝学的な見地から個体生態学的手法に疑問を投げかけている。したがって，個体群の動態を個体生態学的に明らかにしようとする場合，複数のクローン株について増殖生理を明らかにして行く必要があろう。

上述のように水温と塩分に対する増殖応答は珪藻種によってそれぞれ異なった。しかし，大別すると水温と塩分の変化に敏感で高温かつ低塩分で増殖できない種（*C. didymum* var. *protuberans*，*S. costatum* 及び *Thalassiosira* sp.）と，温度のみに敏感で塩分の影響がほとんどない種（*D. brightwellii*）に区別できた。ところで，NAKAHARA (1978) は舞鶴湾に出現する植物プランクトンの季節変化を詳細に調べ，*S. costatum* と *C. didymum* の出現の季節性には高い正の相関が見られることを示した。彼はその要因を両種の好適増殖条件が等しいか，あるいは一方の種によって他種の増殖が促進されたためと考えた。本研究結果は両種の増殖好適条件が等しいという前者の考えを実験的に裏付けたことになる。

第III章で述べたように，浦ノ内湾における珪藻類と *G. nagasakiense* の出現盛期には相違が見られた (Fig. 3-17)。すなわち，珪藻類の出現は5月から9月後半にかけて散発的で小規模であったが，10月から12月初旬にかけての期間，及び2月には高い細胞密度 ($>10^3$ cells ml^{-1}) で出現した。一方，*G. nagasakiense* は珪藻と相反するように7～8月の夏季と12月中旬から1月初旬にかけての冬季に比較的高い密度 ($>10^2$ cells ml^{-1}) で出現した。ではこのような出現時期の相違は何に起因しているのであろうか。GOLDMAN and RYTHER (1976) は水温が植物プランクトン種の遷移に大きく影響を及ぼすことを連続培養実験によって明らかにした。すなわち，10℃以下では *S. costatum* が優占するが，温度の上昇とともに優占種が *Phaeodactylum tricornutum* から *Nitzschia closterium* へと変化し，さらに25℃を越えると珪藻以外の鞭毛藻が卓越した。したがって夏季における珪藻類の衰退は，本実験結果からも明らかなように，高温及び低塩分で増殖できないといった珪藻類の増殖特性によって説明されよう。それに対して，*G. nagasakiense* 等の渦鞭毛藻は高温でも増殖可能であるため，夏季に卓越できるものと考えられる。このように温度は夏季に両者の出現の相違をもたらす重要な要因の一つであると考えられる。

ところが，初冬（12月中旬～1月下旬）及び初春（3月）における珪藻出現密度の低下は水温と塩分では説明できず，他の要因を考慮する必要がある。北半球の温帯域ではこの季節の光強度は弱く，さらに日照時間も短いため，植物プランクトンは光制限下におかれているものと考えられる。したがって，この時期の珪藻類の減少要因の一つには光条件が挙げられる。さらに，珪藻類は生活史上に休眠胞子を形成することが知られており，その形成のため栄養塩の欠乏が重要であることが指摘されている（HARGRAVES and FRENCH 1975, 1983, SMETACEK 1985）。初冬及び初春における珪藻密度の減少の以前には高い増殖が見られている（Fig. 3-17）。したがって，秋及び2月に見られた高密度の増殖によって水域の栄養塩レベルが低下し，それによって珪藻類の胞子形成が行われ，沈降によって水柱から消失して行ったものと推察される。栄養塩をめぐる競合者である珪藻が排除されたことにより，*G. nagasakiense* は低温によって増殖速度は低下するものの着実に個体群密度を高めることができたのであろう。

TANAKA *et al.* (1983) は英虞湾から分離した植物プランクトンの増殖最適塩分に基づき，それらが34‰付近の塩分が好適な群（外洋性型），28‰が好適な群（沿岸性型），そして25‰以下の塩分が好適な群（河口域型）の3群に区別できることを示した。さらにそれらの群に属する植物プランクトンの出現に季節性が見られ，外洋性群は河口域性群に比べて夏季に多く冬に少ない傾向を認めた。ただしこの季節性と現場の塩分とが一致しないことから，塩分は種組成の変化をもたらす要因ではないと考察している。

以上のように水温と塩分はそれら単独では種の遷移機構を説明するものではないが，ここで示されたように *G. nagasakiense* と珪藻との出現時期の違いを律する重要な要因であることは間違いないと考えられる。

第4節　*G. nagasakiense* の増殖に及ぼす栄養塩（窒素，リン）の影響

自然条件下における植物プランクトンは互いに限りある栄養塩を競合していると考えられる。したがって，赤潮の発生機構を考える上で，赤潮藻類がどのような形態の栄養塩をどの位の速度で取り込み増殖に用いているかといった，栄養塩濃度と増殖速度の定量的関係を明らかにすることは重要な課題である。栄養塩の吸収及び利用能に関して，特定種が他種より生態的に優位であるならば，流入・回帰する栄養塩を直ちに吸収することによって海域における栄養塩レベルを低く保ち，他種の増殖を制限することにより生息場の独占を図ることが可能であろう。しかるに，栄養塩の利用特性と増殖の動力学（Kinetics）の詳細が明らかにされている赤潮藻類は，ラフィド藻の *C. antiqua* と *H. akashiwo* の2種のみである（TOMAS 1978, 1979, 1980, WATANABE *et al.* 1982, NAKAMURA and WATANABE 1983a,b）。

本節ではまず *G. nagasakiense* の培養実験に必要な人工海水培地の検討を行い，次に *G. nagasakiense* による形態別窒素及びリンの利用能を把握し，同時に実験を行った珪藻類のそれと比較した。最後に窒素あるいはリン制限下における *G. nagasakiense* の増殖動力学を検討し，赤潮発生に関わる栄養塩の影響について考察した。

材料及び方法

1. 供試株と培地

実験に用いた *G. nagasakiense* は1985年に周防灘で分離後，ピペット洗浄法（岩崎 1967）によって無菌化したクローン株（G303 AX-2）である。また比較のため用いた珪藻類は前節で用いた広島湾産の *C. didymum* var. *protuberans, D. brightwellii, S. costatum, Thalassiosira* sp. の無菌クローン株である。培地には特に明記しない場合は改変 SWM-3（Chen *et al.* 1969，伊藤・今井 1987）を用いた。

2. *G. nagasakiense* 用の人工海水培地の検討

検討した人工海水培地は ASP_2-NTA（Iwasaki 1961），Medium K（Keller *et al.* 1987），ESAW（Harrison *et al.* 1980），NH-15（Gates and Wilson 1960）の4種類である。ESAW については沈澱を避けるため培地組成を2つに分けてオートクレーブする方法と，孔径0.1 μm のポリカーボネートメンブレンフィルター（Nuclepore 社）で濾過滅菌する方法の2通りで培地を調製した。これらの培地を10 m*l* づつネジ口試験管に分注し，それに天然海水を基本とした改変SWM-3で継代培養を行っていた *G. nagasakiense* を1 m*l* 接種し25℃，120 μE $m^{-2}s^{-1}$（明暗周期は14hL:10hD）の条件で培養を行い，増殖の可否を調べた。増殖が見られた場合には更に同種の培地に植え継ぎ，継代培養の可能性を検討した。

3. *G. nagasakiense* の細胞内窒素及びリン含量

G. nagasakiense を対象となる窒素及びリンを除いた改変 SWM-3培地に接種し，2週間の前培養を行った。単一の窒素源としては硝酸（$NaNO_3$），アンモニア（NH_4Cl）あるいは尿素を，単一のリン源としては無機リン（Na_2HPO_4）あるいはグリセロリン酸ナトリウムを用いた。SWM 3培地の基本海水には黒潮表層水を用い，窒素及びリンの添加量はそれぞれ0～25 μM，0～2.5 μMとした。窒素源に関する実験の際にはリン源としてリン酸ナトリウムを，またリン源の実験には窒素源として硝酸ナトリウムを，それぞれ SWM-3 の基本組成通り添加した（N: 2 mM, P:100 μM）。なおオートクレーブによる変化（McLachlan 1979）を防ぐため，これらの窒素・リン源は濾過滅菌後（0.1 μmシリンジフィルター，ANOTEC 社），前もってオートクレーブしておいた窒素あるいはリン無添加の SWM-3 へ無菌的に加えた。このようにして調製した培地100 m*l* を分注した三角フラスコに前培養を接種し（接種密度 50 cells ml^{-1}），25℃，130 μE $m^{-2}s^{-1}$（明暗周期 12hL:12hD）で培養した。その後1週間おきに検鏡による細胞数の計数を行った。さらに最大収量と添加栄養塩濃度から次式に従って細胞内含量（Q）を計算した。

$$Q = \frac{S}{N_t - N_0}$$

ここでSは初期栄養塩濃度（μM），N_t と N_0 はそれぞれ最高細胞密度，接種細胞密度（cells ml^{-1}）を示している。またそれらの差（$N_t - N_0$）を最大収量とした。

4.珪藻類による形態別窒素及びリンの利用能

先に示した4種の珪藻類は対象となる窒素あるいはリンを除いた改変SWM-3培地であらかじめ10日間前培養された。窒素源としては，硝酸（$NaNO_3$），アンモニア（NH_4Cl）あるいは尿素を，またリン源としては無機リン（Na_2HPO_4）あるいはグリセロリン酸ナトリウムを用いた。上述の方法で調製したSWM-3培地（窒素：0～250 μM，リン：0～25 μM）をPPキャップ試験管（ϕ25 mm）に分注し，それぞれの珪藻類を接種後，温度15℃，光強度280 μE $m^{-2}s^{-1}$（明暗周期14hL：10hD）で培養した。培養開始後，蛍光光度計（TURNER DESIGN社 model 110）により毎日 in vivo クロロフィル蛍光を測定し，増殖の有無を判定した。

5. *G. nagasakiense* による窒素及びリンの利用能と栄養塩制限下における増殖の動力学

窒素あるいはリン無添加のSWM-3で2週間にわたり前培養した *G. nagasakiense* を，上述の方法で調製した形態別窒素（0～250 μM）あるいはリン（0～25 μM）を含むSWM-3培地を分注したPPキャップ試験管（ϕ25 mm）に接種し，温度25℃，光強度250 μE $m^{-2}s^{-1}$（明暗周期14hL：10hD）で培養した。窒素及びリンの添加はすべて濾過滅菌法（0.1 μm シリンジフィルター，ANOTEC社）によって行った。培養開始後1日おきに蛍光光度計により in vivo クロロフィル蛍光を測定し，その結果に基づき，第1節に示した計算式で増殖速度（divisions day^{-1}）を計算した。増殖速度と栄養塩濃度との関係を表すために，以下に示すMonodの式の適用を検討した。

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S}$$

ここでμ_mとK_sはそれぞれ最大増殖速度及び増殖速度の半飽和定数（μM）を示す。これらの増殖パラメータは次の関数f（μ_m,K_s）を最小にする値をシンプレックス法を用いた逐次計算法によって求めた。

$$f(\mu_m, K_s) = \sum_{i=1}^{n} [\mu_i - \mu_m S_i / (K_s + S_i)]^2$$

ここでμ_i，S_iは増殖速度及び栄養塩濃度の測定値である。

結　果

1.人工海水培地による *G. nagasakiense* の増殖

人工海水培地としてASP[2] NTA，Medium K，ESAW，NH-15を検討したが，いずれの場合にも3回の植え継ぎ以降 *G. nagasakiense* は増殖せず，継代培養には至らなかった。そのため以下の実験には1990年8月に高知沖（32° 10'N，134° 05'E）で採取した黒潮表面水（DIN：0.81 μM，DIP：0.028 μM）を基本とした改変SWM-3を用いた。

2. *G. nagasakiense* の細胞内窒素・リン含量

種々の窒素濃度から得られた *G. nagasakiense* の最大収量と細胞内窒素含量（Q）をTable4-5に示す。最大収量は窒素濃度の上昇とともに増加し，25 μM の硝酸とアンモニアではほぼ同様の細胞密度（6～7×10^3 cells ml^{-1}）に達した。しかし25 μMの尿素における収量は硝酸等の2分の1であった。細胞内窒素含量は硝酸で平均3.95 pmol $cell^{-1}$，アンモニアで平均3.74 pmol $cell^{-1}$で，ほぼ等しい値が得られた。

種々のリン濃度における最大収量と細胞内リン含量（Q）をTable 4 6に示す。*G. nagasakiense* の最大収量はリン濃度の上昇とともに増加した。無機リンよりもグリセロリン酸の方で高い収量が得られた。細胞内リン含量は前者で0.35 pmol $cell^{-1}$，後者で0.23 pmol $cell^{-1}$と算出された。

3. ***G. nagasakiense*** **による形態別窒素・リン利用能**

最大収量（in vivo クロロフィル蛍光値）に及ぼす形態別窒素及びリン濃度の影響をFig. 4-22に示す。本種は窒素源として硝酸，アンモニア及び尿素のすべてを利用した。硝酸及びアンモニアの場合には，窒素濃度の上昇とともに最大収量も増加した。しかし，尿素では6.4 μM

Table 4-5. Final cell yields (N: cells ml^{-1}) and minimum cell quotas of nitrogen (Q: pmol $cell^{-1}$) in *G. nagasakiense* grown at the different concentrations of nitrogen.

	$NaNO_3$		NH_4Cl		Urea	
(μM)	N	Q	N	Q	N	Q
None	312	2.60	312	2.60	312	2.60
0.256	286	3.72	313	3.41	400	3.31
0.64	390	3.72	374	3.88	539	3.88
1.6	498	4.83	569	4.24	1,170	3.43
4	1,020	4.72	1,420	3.39	2,280	3.86
10	2,520	4.29	2,410	4.49	2,910	7.15
25	6,820	3.78	6,150	4.20	3,140	16.18
Mean		3.95		3.74		5.77

Table 4-6. Final cell yields (N: cells ml^{-1}) and minimum cell quotas of phosphorus (Q: pmol $cell^{-1}$) in *G. nagasakiense* grown at the different concentrations of phosphorus.

	NaH_2PO_4		Glycerophosphate	
(μM)	N	Q	N	Q
0.0256	145	0.37	240	0.22
0.064	259	0.36	499	0.18
0.16	636	0.30	1,083	0.17
0.4	1,790	0.24	2,730	0.16
1.0	3,720	0.28	6,530	0.16
2.5	6,910	0.37	11,040	0.23
Mean		0.35		0.23

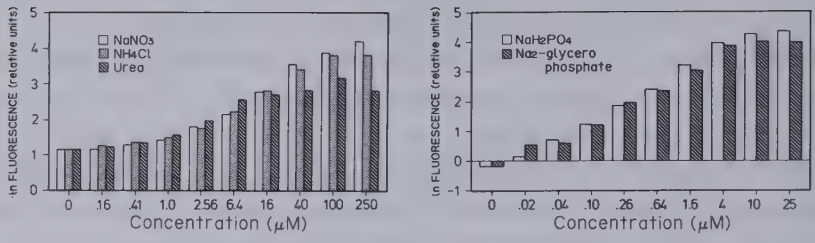


Fig.4-22. Growth of *G. nagasakiense* at different nitrogen (left) and phosphorus (right) sources.

以上になると最大収量の増加は見られなかった。一方，本種はリン源として無機リン及びグリセロリン酸の両者を利用し，その最大収量は4 μM以上でほぼ飽和した（Fig. 4-22）。

4.珪藻類の形態別窒素・リン利用能

4種の珪藻類による形態別窒素及びリンの利用能をFig. 4-23に示した。これら4種は窒素源として硝酸とアンモニアをほぼ同程度利用した。しかし，尿素添加区の最大収量が無添加区を若干でも上回ったのは *D. brightwellii* のみであり，他の珪藻類は尿素を全く利用しなかった。また，珪藻類は無機・有機両形態のリンを利用したが，*S. costatum* と *Thalassiosira* sp. は低濃度での増殖が悪く，特に *S. costatum* は低濃度のグリセロリン酸をほとんど利用しなかった。このように珪藻類は有機態窒素である尿素が利用できず，また低濃度で存在するリン（特に有機態リン）の利用能力が低いことが判明した。

5.*G. nagasakiense* の増殖の動力学

種々の形態別窒素濃度（硝酸，アンモニア及び尿素）で培養した *G. nagasakiense* の増殖曲線をFigs. 4-24～4-26に示す。硝酸の場合，添加濃度が高くなるにつれて最大収量が増大し，さらに対数増殖期の期間も長くなった(Fig. 4-24)。アンモニアの場合にも硝酸とほぼ同様の増殖曲線が得られた。ただし，250 μM で増殖曲線の傾きがかなり小さくなった（Fig. 4-25)。一方，尿素の場合には硝酸やアンモニアとは異なる結果が得られた。すなわち，培養開始から4日目に増殖曲線の変曲点があり，それ以降で曲線の傾きが減少した(Fig. 4 26)。これは基本海水に含まれていた無機態窒素(0.81 μM)が先に利用され，それが枯渇した後に尿素が利用されたことを示している。したがって，動力学的解析には4日以降の直線部分について求めた増殖速度を用いた。

種々の形態別リン濃度で培養した *G. nagasakiense* の増殖曲線を Fig. 4-27と4-28に示す。本種は無機リン酸（Fig. 4-27）及びグリセロリン酸（Fig. 4-28）でほぼ同様の増殖を示した。すなわち，低濃度ではほとんど増殖が見られないが，リン濃度の増加につれて増殖曲線の傾き及び収量ともに増大し，4 μM以上ではほぼ同じ増殖曲線が得られた。

以上の増殖曲線から増殖速度を計算し，先に示した逐次計算法によって増殖パラメータ μ_m 及び K_s を求めた（Table 4-7)。μ_m については尿素を除いた窒素源及びリン源で本種の最大増殖速度である1.0 division day^{-1}（飯塚・峯 1983）に相当する値が得られた。しかし尿素ではそ

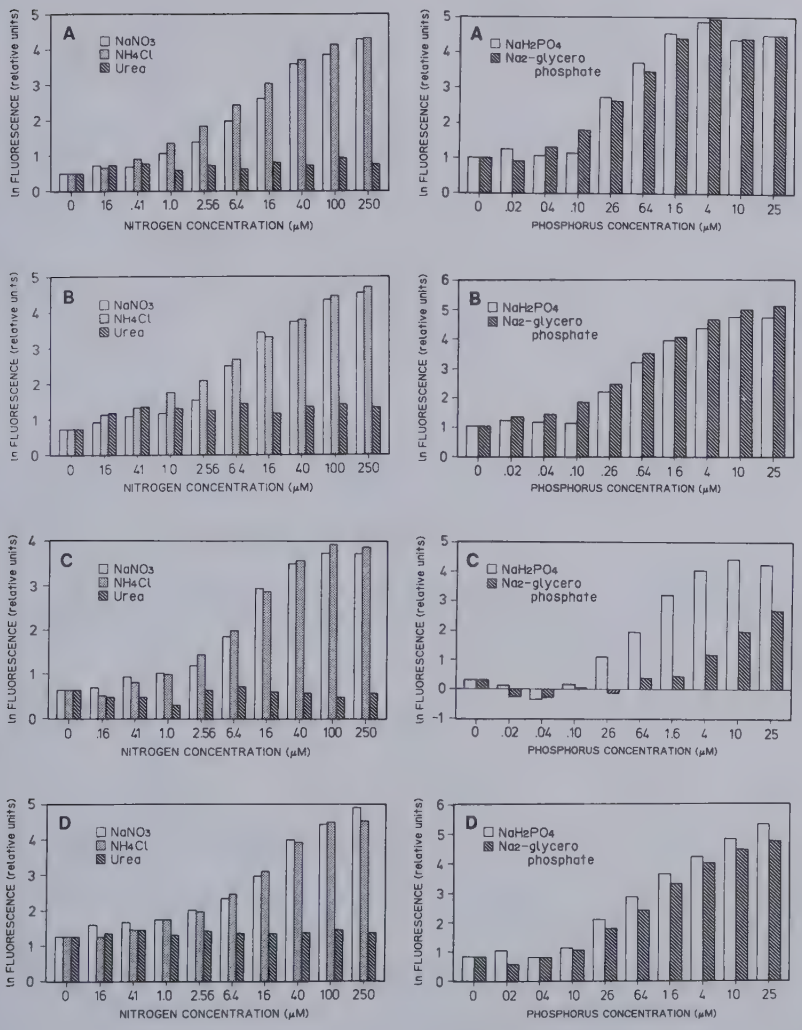


Fig.4-23. Growth of four species of diatom at different nitrogen (left) and phosphorus (right) sources.
A: *C. didymum* var. *protuberans*, B: *D. brightwellii*,
C: *S. costatum*, D: *Thalassiosira* sp.

れらの5分の1に留まった。また，窒素に関する K_s 値は0.6～1.0 μM で，アンモニアで最も小さかった。リンの K_s 値は0.15 μM で無機態及び有機態リン間に差は見られなかった。

μ_m と K_s によって決定された双曲線と実際の栄養塩濃度で得られた増殖速度の測定値をプロットしたのが Fig. 4-29（窒素）及び Fig. 4-30（リン）である。Figs. 4-29と4-30に示される

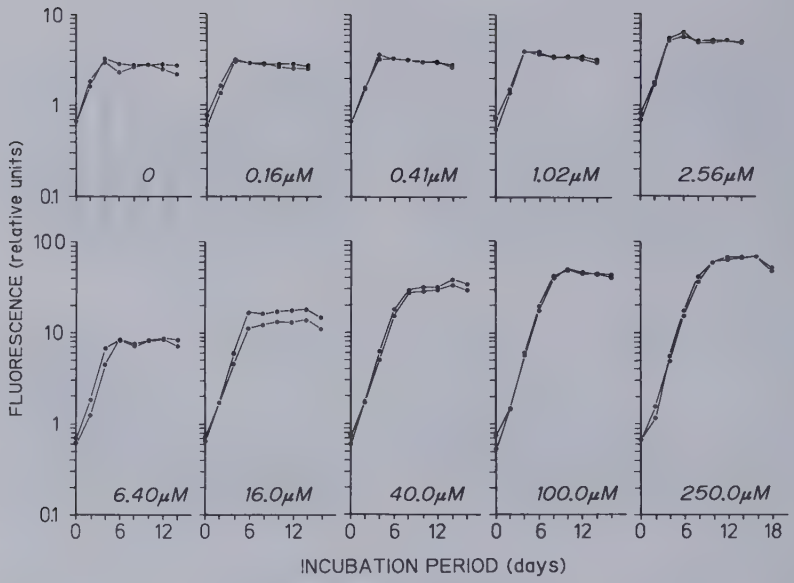


Fig.4-24. Growth curves of *G. nagasakiense* at different concentrations of nitrate at 25 ℃. Numbers below each curve are the nitrate concentrations added to the medium.

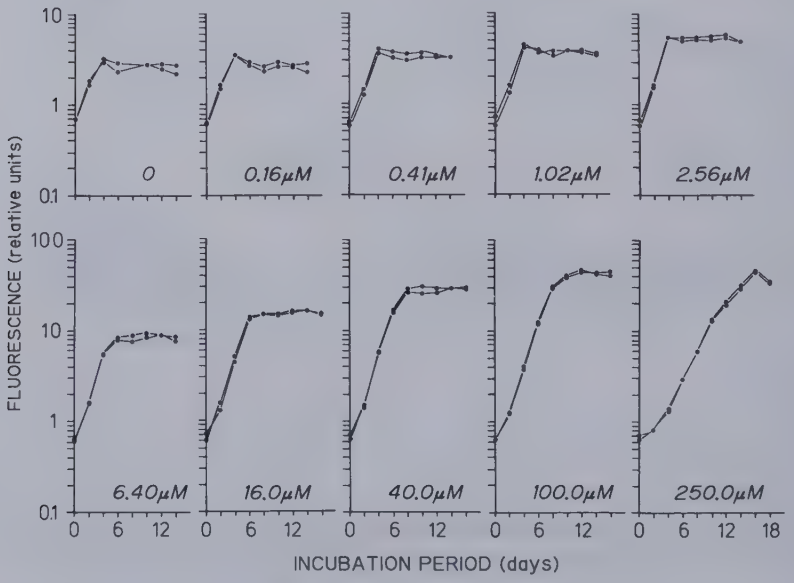


Fig.4-25. Growth curves of *G. nagasakiense* at different concentrations of ammonium at 25 ℃. Refer to Fig. 4-24 for other legends.

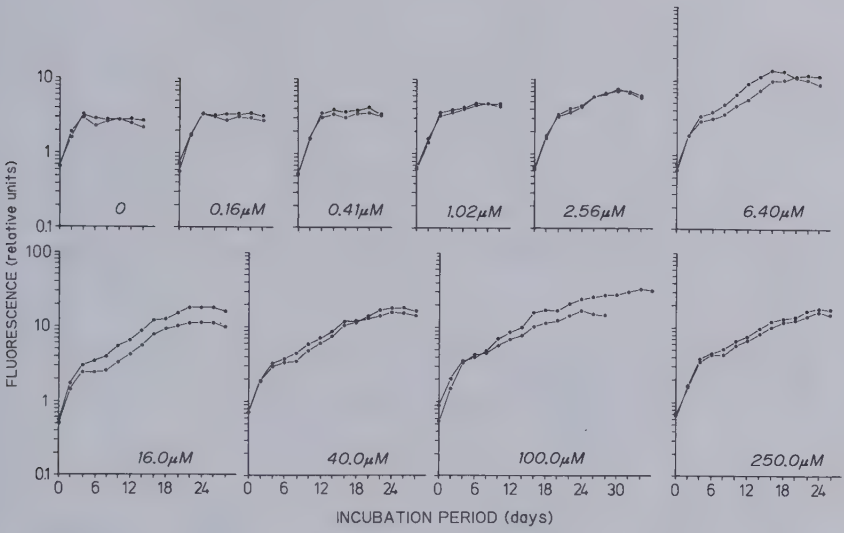


Fig.4-26. Growth curves of *G. nagasakiense* at different concentrations of urea at 25 ℃. Refer to Fig. 4-24 for other legends.

Table 4-7. Growth parameters of *G. nagasakiense* for nitrogen and phosphorus sources.

Nutrient	μ_m(divisions day^{-1})	K_s(μM)
$NaNO_3$	0.97	0.78
NH_4Cl	0.98	0.58
Urea	0.18	1.02
NaH_2PO_4	0.82	0.14
Glycerophosphate	0.83	0.15

ように理論値と測定値が良く一致することから，栄養塩濃度と *G. nagasakiense* の増殖速度との関係は Monod の式に従うことが明らかとなった。まず硝酸態窒素の場合，増殖速度は窒素濃度の増加とともに急激に増大し，添加濃度6.4 μM でほぼ飽和した(Fig. 4-29)。アンモニアの場合も硝酸と同様の関係が見られた。ただし，100 μM 以上から増殖速度が低下し始め，250 μM では最大増殖速度の 2 分の 1 となった (Fig. 4-29)。尿素の場合には，硝酸等に比べ増殖速度が非常に小さい反面，高濃度でもその低下が見られなかった。無機リンとグリセロリン酸における増殖速度とリン濃度との間にも Monod の式で表される双曲線関係が見られた (Fig. 4-30)。両形態別リンに対する *G. nagasakiense* の増殖応答はほぼ等しかった。

窒素制限(N:20 μM, P:20 μM)及びリン制限(P: 2 μM, N:200 μM)培地で *G. nagasakiense* を培養すると，それらの細胞の大きさが異なる現象が認められた (Fig. 4-31)。それらの細胞長と細胞幅を計測した結果，リン制限では平均細胞長29.9 μm, 窒素制限では22.2 μm で，両者の間には統計的に有意な差が認められた(t-検定, $p<0.01$)。さらにリン制限細胞では細胞長よ

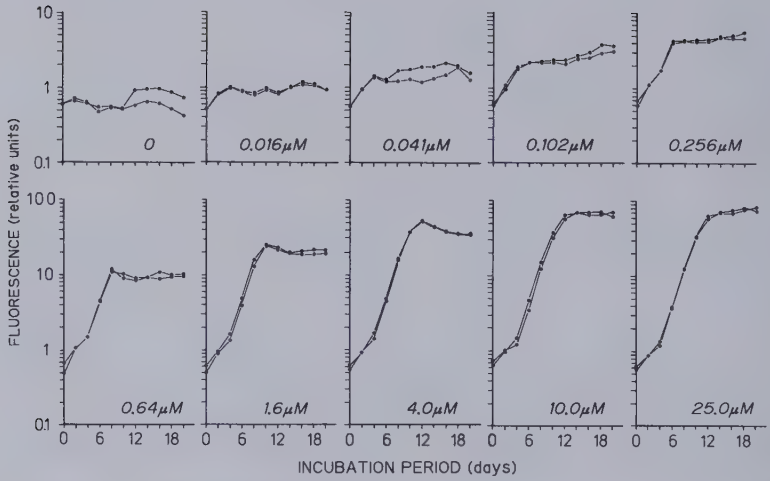


Fig.4-27. Growth curves of *G. nagasakiense* at different concentrations of phosphate at 25 ℃. Refer to Fig. 4-24 for other legends.

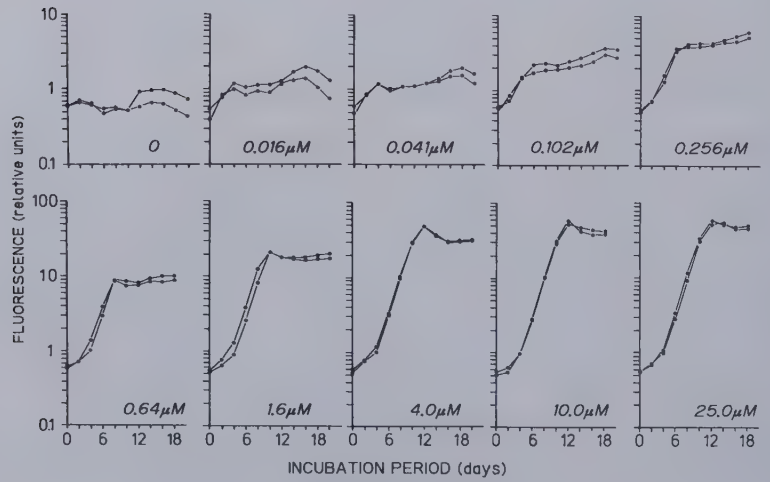


Fig.4-28. Growth curves of *G. nagasakiense* at different concentrations of glycerophosphate at 25 ℃. Refer to Fig. 4-24 for other legends.

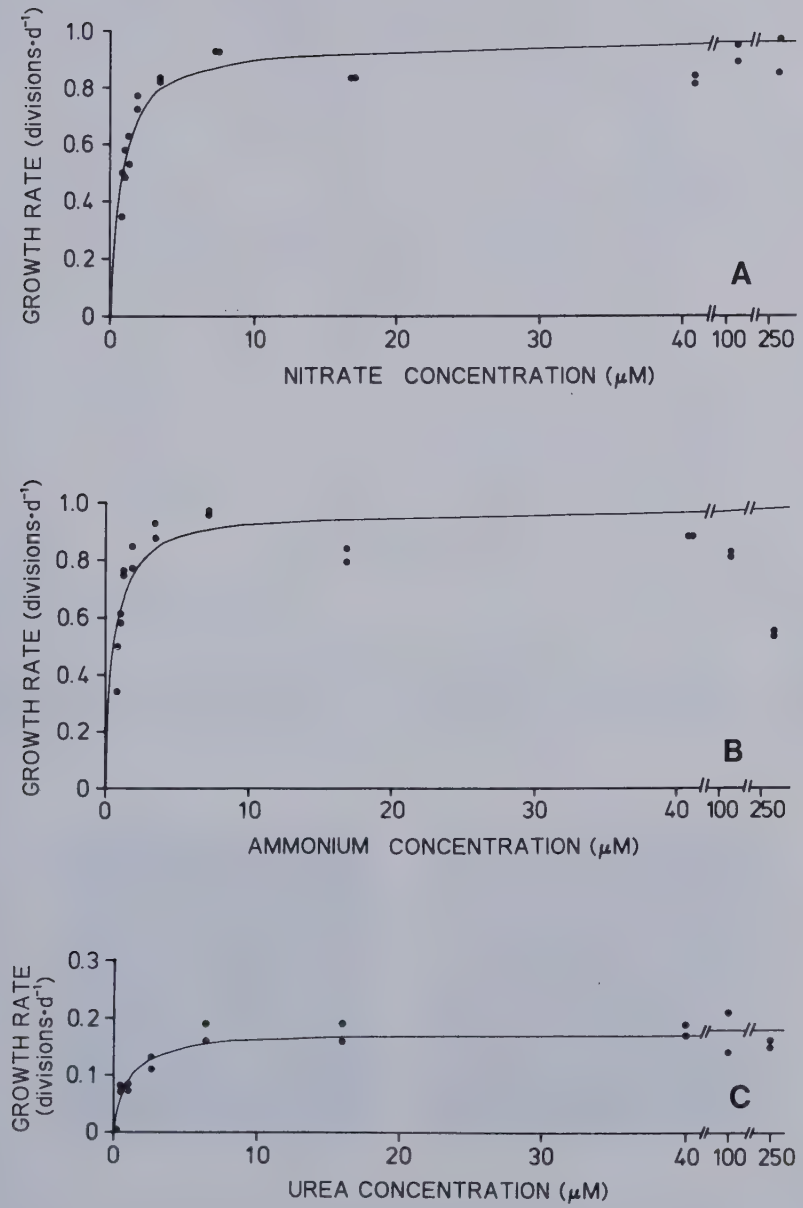


Fig.4-29. Relationship between the growth rate of *G. nagasakiense* and different nitrogen concentrations. A: nitrate, B: ammonium, C: urea. Rectangular hyperbola in the figure was fitted by simplex minimization procedure.

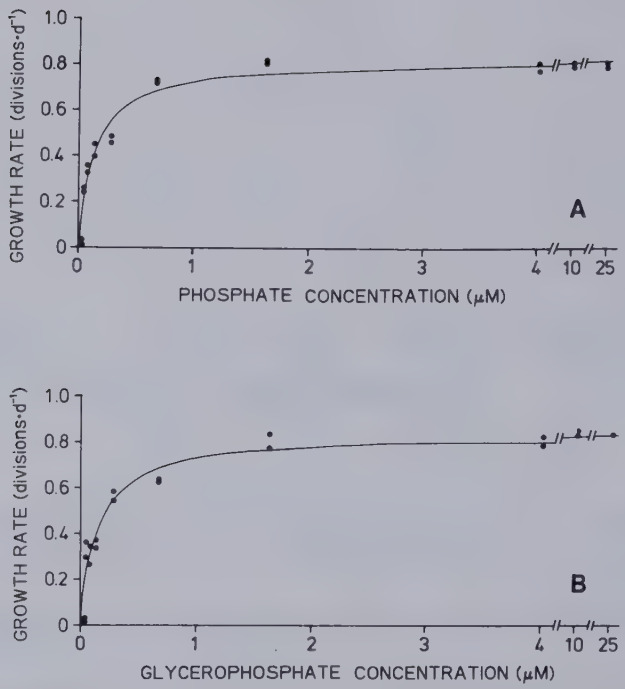


Fig.4-30. Relationship between the growth rate of *G. nagasakiense* and different phosphorus concentrations. A: phosphate, B: glycerophosphate. Refer to other legends for Fig. 4-29.

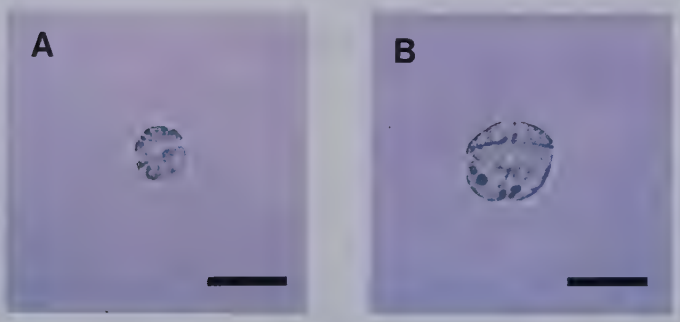


Fig.4-31. Photomicrographs of the vegetative cells of *G. nagasakiense* grown in nitrogen-limited (A) and phosphorus- limited (B) media. Scale bars=30 μm.

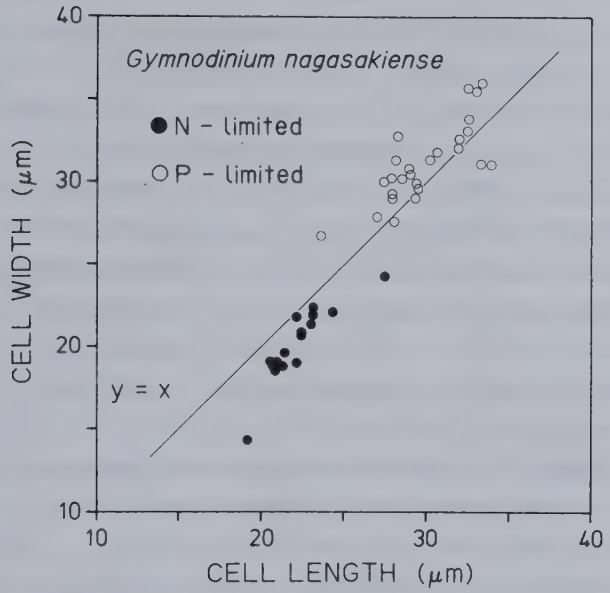


Fig.4-32. Scatter diagram of cell size of *G. nagasakiense* grown in nitrogen-limited and phosphorus-limited media.

りも細胞幅が大きい傾向が見られた(Fig. 4 32)。これらの細胞について第VI章で述べる顕微鏡蛍光測光法によって核DNA量を調べたところ，両者の間に差は見られなかった。しかし，細胞当りのクロロフィル蛍光強度は窒素制限細胞の方が低くリン制限細胞の60%であった。

考　察

人工海水培地による *G. nagasakiense* の無菌株の培養は不可能であった。この原因については現在のところ不明であるが，培地組成に含まれない未知の微量栄養素が関与している可能性が考えられる。このような現状で本種の栄養塩に対する増殖生理を明らかにするためには，なるべく窒素・リン濃度が低い外洋海水を基本とした培地を使用せざるを得ない。今回用いた黒潮表層水を基本としたSWM-3では，窒素・リンを十分添加することにより本種の最大増殖速度に近い値が得られている(Table 4 7)。したがって，窒素及びリン以外の因子が制限因子となっている可能性はほとんど無く，窒素・リンの効果が正しく評価されているものと判断される。本種と形態的に類似する *Gyrodinium aureolum* でも人工海水培地による培養は成功に至っていない（Dixon and Holligan 1989)。

G. nagasakiense の細胞内窒素含量は平均3.74～3.95 pmol cell^{-1}であった(Table 4 5)。この値は *C. antiqua* の11 pmol cell^{-1}（Nakamura and Watanabe 1983b）と *H. akashiwo* の1.44 pmol cell^{-1}（Watanabe *et al.* 1982）のほぼ中間的な値である。また，細胞内リン含量は0.23～0.35 pmol cell^{-1}と計算された（Table 4-6)。これに関しては *C. antiqua* で1.0 pmol cell^{-1}

(NAKAMURA and WATANABE 1983b), *H. akashiwo* で95 fmol cell^{-1} (WATANABE *et al.* 1982) と報告されており，*G. nagasakiense* で得られた値は細胞サイズから見れば妥当な値であると考えられる。これらの結果から細胞内N:P比を計算すると13となり，いわゆるRedfield比 (C:N:P=106:16:1) に近い値であった。これらの細胞内窒素・リン含量と現場における栄養塩濃度との関係から *G. nagasakiense* が現場海水で増殖可能な細胞密度 (AGP) を計算することができる (NAKAMURA and WATANABE 1983b)。Table 4-8に西部周防灘及び浦ノ内湾について計算した結果を示す。Table 4-8に示すように *G. nagasakiense* は天然海水でも100～8,000 cells ml^{-1}の細胞密度まで増殖可能であることが判明した。この細胞密度は物理的・生物的集積が加われば，十分赤潮状態になりうる密度である。ところで，本種は無機態のみならず有機態の窒素・リンも増殖に利用可能であった(Fig. 4-22)。さらに現場海域における溶存態窒素・リンの約半分は有機態のもので占められていることも報告されている(城　1986)。しかし，Table 4-8に示した栄養塩には有機態のものは含まれていない。したがって，ここに示した増殖可能密度は過小推定の可能性があり，現場海水の有する潜在的な増殖可能密度は更に大きいものと予想される。なお浦ノ内湾では窒素の方がリンより増殖可能密度が小さく，したがって本海域では窒素が増殖の制限因子になり易いことが推察される。

IWASAKI *et al.* (1990) によれば，五ヶ所湾産の *G. nagasakiense* は300 μgN l^{-1} (=21 μM) のアンモニアと尿素で増殖が阻害されている。さらに，*C. antiqua* は150 μM以上で，また *H. akashiwo* では50 μMのアンモニアで増殖が阻害されることが知られている (TAKAHASHI and FUKAZAWA 1982, NAKAMURA and WATANABE 1983b)。本研究で用いた周防灘産の *G. nagasakiense* は250 μMのアンモニアでも増殖が見られており(Fig. 4-22)，これらの種あるいは株に比して高いアンモニア耐性を有していると言える。

尿素は窒素換算で硝酸やアンモニアの2倍に相当する。したがって，尿素を窒素源とした場合には硝酸等の2倍の最大収量が得られるはずである。ところが，6.4 μM以上の尿素における最大収量は硝酸等より低かった(Fig. 4-22)。このような尿素による増殖阻害は，有毒渦鞭毛藻 *Gonyaulax catenella* (現在 *Alexandrium catenella*) についても報告されている (NORRIS and

Table 4-8. Minimum cell quotas of *G. nagasakiense* for nitrogen and phosphorus (Q: pmol cell^{-1}), DIN and PO_4-P concentrations of the seawater (S: μM) in western Suo Nada and Uranouchi Inlet, and estimated growth potentials (S/Q: $\times 10^3$ cells ml^{-1}).

Nutrient	Q	Suo-Nada		Uranouchi Inlet	
		S*1	S/Q	S*2	S/Q
Nitrogen	3.85	0.80-10.55	0.21-2.74	1.23-18.15	0.32-4.71
Phosphorus	0.29	0.03- 0.71	0.10-2.45	0.13- 2.42	0.45-8.34

*1 Monthly mean value (Fukuoka Buzen Fish. expl Stn.: 1987-1989)
*2 Mean of each survey from Apr. 1989 to Mar. 1990 (Kochi Pref. Fish. expl Stn.: Personal communication)

CHEW 1975)。

尿素を単一の窒素源とした場合，μ_m が著しく低く K_s は大きかった(Table 4-7, Fig. 4-29)。したがって，その利用形態は硝酸等とは異なるものと考えられる。尿素の取り込みに関しては2つの酵素（Urease あるいは ATP：urea amidolyase）が関与することが知られている(LEFTLEY and SYRETT 1973)。渦鞭毛藻では尿素は Urease によってまず2分子のアンモニアに加水分解され，それが取り込まれるようである。実際，渦鞭毛藻 *Prorocentrum micans* に尿素を単一の窒素源として与えた場合，まず培地中にアンモニアが蓄積され，それがある濃度以上になると増殖が見られることが報告されている（UCHIDA 1976)。これらのことより，*G. nagasakiense* では尿素の加水分解速度が何等かの原因で律速要因となって十分なアンモニア濃度が得られず，その結果として増殖速度が低下したものと考えられる。

有機態リンであるグリセロリン酸は多くの赤潮藻類によって利用されることが報告されている（MAHONEY and MCLAUGHLIN 1977, IWASAKI 1979)。しかしラフィド藻 *H. akashiwo* の一部の株や *C. antiqua* はグリセロリン酸を利用しない（WATANABE *et al.* 1982, NAKAMURA and WATANABE 1983b)。さらに，本研究の結果代表的な珪藻類は尿素がほとんど利用できず，さらに低濃度のリンで増殖が悪い種が認められた(Fig. 4-23)。したがって，有機態の窒素・リンの利用能から見れば，*G. nagasakiense* はこれらの種に比べて生態的に優位にあると考えられる。

K_s 値の生態学的重要性については DUGDALE（1967）や EPPLEY and COATSWORTH（1968）によって指摘されている。この K_s 値は栄養塩濃度に対する親和性の指標であり，K_s が小さいほど低濃度の栄養塩でも増殖が可能であることを示すものである。そこで *G. nagasakiense* で得られた結果と比較するため，種々の海産微細藻類について報告されている K_s 値を Table 4-9に取りまとめた。それによると，*G. nagasakiense* で得られた K_s 値は，各栄養塩ともに，これまで他種について得られている範囲に収まっており，しかもかなり小さい値であることが判る。特に渦鞭毛藻の中では最低の値である。EPPLEY *et al.* (1969) は K_s 値に見られる一般的傾向として，(1)大型種は高い K_s 値を有する，(2)硝酸の K_s 値が高いとアンモニアのそれも高い，(3)外洋性種の K_s 値は沿岸性種に比べて低い，(4) K_s 値は温度に依存する，を挙げている。TOMAS (1979) に従って細胞の大きさから期待される硝酸の K_s 値を求めると測定値の約5倍の4 μM となり，*G. nagasakiense* は細胞の大きさの割には小さい K_s 値を有し，外洋性種について得られた値(EPPLEY *et al.* 1969) に匹敵していることが判明した(Table 4-9)。したがって，本種は低い栄養塩濃度の下でも十分増殖できる特性を備えた生物であると言える。

K_s 値は温度によって影響を受け，温度の上昇に伴い増大することが報告されている（THOMAS and DODSON 1974, EPPLEY 1977)。したがって，高水温期に増殖する植物プランクトンは高温とそれによる栄養塩への要求性の増加といった2重のストレスを受けることになる。前節で示したように高水温は珪藻類の増殖に不適であった（Figs. 4-18～4-21)。さらに，その増殖は低濃度のマクロ栄養素のもとでは非常に悪いことが報告されている（TAKAHASHI and FUKAZAWA 1982)。以上のことは，成層が著しい夏季の内湾域における物理・化学的環境

Table 4-9. Summary of reported half-saturation constant (K_s: μM) for nitrogen and phosphorus on various marine phytoplankton species.

Nutrient	Species	K_s	Reference
Nitrate	*Asterionella japonica*	0.7-1.3	Eppley *et al.* 1969
		0.9-1.1	Romeo & Fisher 1982
	Chaetoceros gracilis	0.1-0.3	Eppley *et al.* 1969
	Coscinodiscus lineatus	2.4-2.8	Eppley *et al.* 1969
	C. wailesii	2.1-5.1	Eppley *et al.* 1969
	Ditylum brightwellii	0.6	Eppley *et al.* 1969
		2.0-4.0	Eppley & Coatsworth 1968
	Fragilaria pinnata	0.6-1.6	Carpenter & Guillard 1971
	Leptocylindrus danicus	1.2-1.3	Eppley *et al.* 1969
	Rhizosolenia stolterfothii	1.7	Eppley *et al.* 1969
	Skeletonema costatum	0.4-0.5	Eppley *et al.* 1969
		2.1	Romeo & Fisher 1982
	Thalassiosira pseudonana	0.5-1.0	Eppley & Renger 1974
	Alexandrium tamarense	1.5-2.8	MacIssac *et al.* 1979
	Gonyaulax polyedra	8.6-10.3	Eppley *et al.* 1969
	Gymnodinium sanguineum	3.8	Eppley *et al.* 1969
		1.0-6.6	Thomas & Dodson 1974
	Chattonella antiqua	0.9	Nakamura & Watanabe 1983c
	Olisthodiscus luteus	2.0-2.5	Tomas 1979
	Gymnodinium nagasakiense	0.8	This study
Ammonium	*Asterionella japonica*	0.6-1.5	Eppley *et al.* 1969
	Chaetoceros gracilis	0.3-0.5	Eppley *et al.* 1969
	Coscinodiscus lineatus	1.2-2.8	Eppley *et al.* 1969
	C. wailesii	4.3-5.5	Eppley *et al.* 1969
	Ditylum brightwellii	1.1	Eppley *et al.* 1969
	Leptocylindrus danicus	0.5-3.4	Eppley *et al.* 1969
	Rhizosolenia stolterfothii	0.5	Eppley *et al.* 1969
	Skeletonema costatum	0.8-3.6	Eppley *et al.* 1969
	Thalassiosira pseudonana	0.02-0.66	Eppley & Renger 1974
	Alexandrium tamarense	1.9	MacIsaac *et al.* 1979
	Gonyaulax polyedra	5.3-5.7	Eppley *et al.* 1969
	Gymnodinium sanguineum	1.1	Eppley *et al.* 1969
	Olisthodiscus luteus	2.0-2.3	Tomas 1979
	Gymnodinium nagasakiense	0.6	This study
Urea	*Ditylum brightwellii*	0.4	McCarthy 1972
	Skeletonema costatum	1.4	McCarthy 1972
	Thalassiosira fluviatilis	1.7	McCarthy 1972
	Gymnodinium nagasakiense	1.0	This study
Phosphate	*Chaetoceros gracilis*	0.12	Thomas & Dodson 1968
	Thalassiosira pseudonana	0.6-0.7	Perry 1976
	Amphidinium carterae	0.01	Deane & O'Brien 1981
	Chattonella antiqua	0.29	Nakamura & Watanabe 1983c
	Olisthodiscus luteus	1.0-1.98	Tomas 1979
	Pyrocystis noctiluca	1.9-34.0	Rivkin & Swift 1982
	Gymnodinium nagasakiense	0.14	This study

は珪藻類の増殖に極めて不都合であることを示している。それに対して，渦鞭毛藻類やラフィド藻類は表層に比べ低温でかつ栄養塩濃度が高い底層に移動する能力を備えることによってこれらの悪条件を克服し，夏季でもその増殖を可能にしているものと考えられる。事実，HONJO *et al.* (1990) は五ヶ所湾における *G. nagasakiense* が夜間鉛直移動を行っていると報告しており，また第III章で述べたように周防灘においても同様の鉛直移動が示唆されている。

以上のように *G. nagasakiense* は比較的低濃度から高濃度にわたる広い範囲の窒素及びリンで増殖し，さらに有機態の窒素・リンも同様に利用できることが判明した。このことは，本種が外洋域から内湾域にわたる幅広い栄養塩レベルの海域で赤潮を引き起こしている事実とよく一致している。このような栄養塩に対する増殖特性は，前節で述べた幅広い物理的耐性限界と相俟って，本種が種々の環境条件下において個体群の維持を可能にし，さらに他種との競争に打ち勝つための重要な要因であると考えられる。

第V章　*Gymnodinium nagasakiense* の増殖速度の測定

赤潮による漁業被害を防止するため種々の対策が模索されてきたが，実用化に至ったものは皆無に等しい。したがって，赤潮の発生を事前に予知することによって被害の軽減を図ることがより一層重要となってくる（安楽 1985a，1985b）。

赤潮は特定の種の増加が捕食や流出等による減少を上回った結果発生するものと考えられる。したがって，その増加要因を把握することは赤潮の発生機構の解明のみならず，その発生を予知する上でも重要な課題である。CHANG and CARPENTER (1985) は，北米東海岸における *Gyrodinium aureolum* 赤潮の発生要因の一つにこの種の高い増殖速度を挙げている。また飯塚 (1987) は，大村湾の *G. nagasakiense* 個体群が赤潮発生直前まで約10日間にわたり本種の最大増殖速度（1.0 division day^{-1}）で指数的に群密度を増大すると述べている。以上のことから，現場個体群の増殖速度を測定することによって，その個体群の動態を把握し，赤潮の発生を予知することが可能ではないかと考えられる。

ところで，現場における植物プランクトンの増殖速度を測定するため，これまで種々の手法が用いられてきた。これらには，炭素や窒素等の元素の同化速度（EPPLEY 1980），ATP 合成速度（SHELDON and SUTCLIFFE 1978），^{14}C による Chlorophyll 標識法（REDALJE and LAWS 1981），DNA 合成速度（FALKOWSKI and OWENS 1982）などの方法が挙げられる。しかし，いずれの方法も群集全体の増殖速度の測定に留まり，特定種ごとの増殖速度は測定できない。さらにこれらの方法は様々な問題点が指摘されている瓶培養によらなければならない。また同位元素を用いる方法は^{14}C や^{15}N の取り込み速度の測定は容易であるが，植物プランクトン生物量の測定が困難であるなどの問題点を有している。

種類別の増殖速度を測定できる方法として，オートラジオグラフ（DOUGLAS 1984）や DNA への^{3}H-Thymidine 取り込み（RIVKIN and VOYTEK 1986）を用いる方法が挙げられる。しか

し，わが国では放射性同位元素の現場での使用が制限されていることや，細胞一個づつを分離しその放射能を測定する必要があることを考慮すると，これらの方法を日常的な調査に応用することは困難である。

一方，細胞数の変化から増殖速度の測定を行う場合でも，水塊の移動，生物自身の移動及び捕食による減耗など，増殖以外にも細胞数の変化をもたらす要素が多い。そのため，信頼できる測定値を得るためには，組織的な調査体制を組む必要が生じる。

このような従来の増殖速度測定法に関わる問題点を克服し，より簡便な手法を開発することを目的として，本章では個体群内に占める分裂中の細胞の割合（Frequency of Dividing Cells；FDC）を指標とした増殖速度測定法（FDC 法）の検討を行った。

第 1 節　培養条件下における増殖速度測定法の検討

前述の FDC 法は，HAGSTRÖM *et al.*（1979）により自然水中の細菌群集の増殖速度測定に適用され，また真核生物である植物プランクトンについても WEILER and CHISHOLM（1976）や WEILER and EPPLEY（1979）らによって用いられている。FDC法によって平均増殖速度を求めるために，種々の計算式が報告されてきたが，MCDUFF and CHISHOLM（1982）はそれらの研究を総説し，理論的説明を加えることによって，部分的同調分裂を行っている個体群について次に示す計算式を提唱した。

$$\mu_{FDC} = \frac{1}{n \cdot T_d} \sum_{i=1}^{n} \ln (1 + f_i) \qquad (1)$$

ここで，μ_{FDC} は FDC から求めた平均増殖速度（divisions day^{-1}），n は試料採取の回数，T_d は細胞分裂に要する時間（day），f_i は i 時間における FDC である。本節では，まず *G. nagasakiense* の細胞分裂過程を室内実験によって明らかにし，次いで FDC 法に不可欠なパラメータである T_d に対する光強度と温度の影響を調べた。

材料及び方法

1. 供試株と培地

実験に用いた *G. nagasakiense* は，1985年 7 月に周防灘から分離しマイクロピペット洗浄法により無菌化したクローン株（G303 AX 2）である。培地には，海水強化培地である改変 SWM-3（CHEN *et al.* 1969，伊藤・今井 1987）を用いた。保存株は温度22℃，光強度100 $\mu E\ m^{-2} s^{-1}$，14hL：10hDの明暗周期下で継代培養を行った。

2. 光制御条件下における T_d の測定

改変 SWM-3培地100 m*l* を分注した300 m*l* 容のフラスコに保存培養を接種し，温度25℃，継代培養と同じ光条件下で 1 週間前培養を行った。その後，培地300 m*l* が入った10本の 1 liter 容三角フラスコに細胞密度が20 cells ml^{-1} となるように前培養を接種した。種々の増殖速度を得

るため，各フラスコを10,30,50,70,90,110,130,150,170及び190 μEm^{-2}s^{-1}の10段階の光強度下に設置して培養を開始した。明暗周期は14hL:10hD(明期は05:00～19:00)，温度は25℃に設定した。その後毎日10:00に細胞数の計数を行い(第IV章 第1節材料及び方法参照)，増殖段階を把握した。8日後，各フラスコにおける培養が中期から後期対数期に達したところで，08:00から24時間にわたり2時間ごとに各フラスコより5 mlの細胞懸濁液を採取し，等量の1％グルタールアルデヒド海水溶液と混合して固定後，冷蔵庫に保存した。

固定試料に蛍光染料4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) を最終濃度で1 μg ml^{-1}となるように添加し，細胞核の染色を行った (IMAI and ITOH 1988)。落射蛍光顕微鏡を用いて，以下の3つの細胞分裂段階に属する細胞をそれぞれ計数した。すなわち，静止核(単核)の細胞(non-dividing cells) (Fig. 5-1 A と E)，2核を有する細胞 (2核細胞：2 nuclei) (Fig. 5-1 B と F及び C と G)，そして細胞質分裂中の細胞 (分裂細胞：paired cells) (Fig. 5-1 D と H) の3段階である。2核細胞と分裂細胞の区別は，細胞内に2核を有しさらに細胞に明瞭なくびれが認められるか否かで行った。すなわち，くびれが明らかな細胞は分裂細胞，そうでないものは2核細胞とした。i時間に得られた各試料について200細胞以上を検鏡し，次式により2核細胞と分裂細胞ごとにそれぞれ f_i を求めた。

$$f_i = D_i / C_i \qquad (2)$$

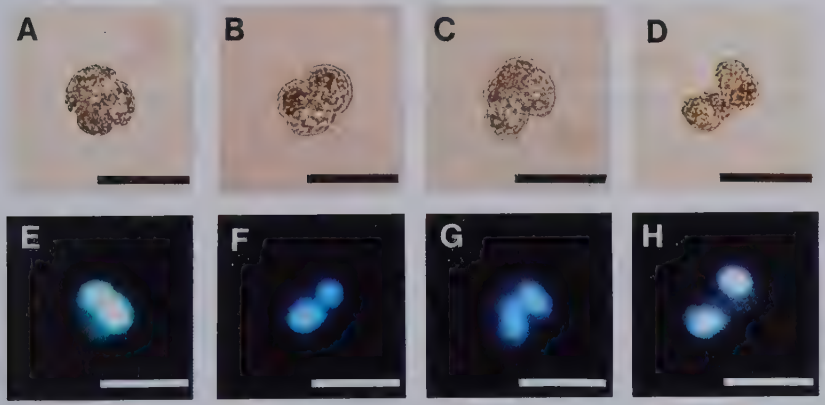


Fig.5-1. Cell division stages of *G. nagasakiense* observed under light (A, B, C, D) and epifluorescence (E, F, G, H) microscope. Scale bar= 30 μm.
A. Vegetative cell without apparent sign of cell division.
B. Vegetative cell which are morphologically undistinguishable from non-dividing cells.
C. Vegetative cell with slightly elongated hypocone.
D. Cell undergoing cytokinesis.
E. The same cell as in A observed under ultraviolet excitation. Blue white fluorescence is visible from the single nucleus (non-dividing stage).
F. The same cell as in B. Two nuclei which divided perpendicular to the antero-posterior axis were visible in each cell (2 nuclei stage).
G. The same cell as in C. The axis of fission of the nucleus is orientated antero-posterially (2 nuclei stage).
H. The same cell as in D. Each daughter cell contains single nucleus (paired cells stage).

ここで，D_i は i 時間における 2 核細胞あるいは分裂細胞の細胞数，C_i は全細胞数をそれぞれ示す。平均増殖速度（μ；divisions day^{-1}）は次式で計算した；

$$\mu = \frac{\ln N_1 - \ln N_0}{\ln 2} \qquad (3)$$

ここで N_0はサンプリング開始時の細胞数，N_1は24時間後の細胞数を示す。そして$\Sigma\ln(1+f_i)$と（3）式による増殖速度から（1）式を解いて，2 核細胞及び分裂細胞に対する T_d を求めた。

3.温度制御条件下における T_dの測定

10,15,20,25及び30℃の温度条件に最低10日間以上馴致させた前培養を，改変SWM-3培地500 m*l*を入れた 5 本の 1 liter容三角フラスコに接種し，それぞれ前培養と同じ温度条件の下，光強度120 μE $m^{-2}s^{-1}$で培養を行った。実験は 2 回行い，それぞれの明暗周期は14hL:10hD 及び12hL:12hD に設定した。実験開始時の増殖段階を対数増殖期初期から中期にそろえるため，各温度における培養日数を 4 日から25日間に調整した。実験開始日の午前10:00から24時間にわたり2時間間隔で細胞懸濁液を10 m*l*採取し，前述の方法で固定し染色後，核の観察を行った。同時に細胞数の増加から（3）式により平均増殖速度を計算した。検鏡結果から$\Sigma\ln(1+f_i)$を求め，（3）式による増殖速度から（1）式を解いて各温度条件下における T_d を計算した。

結　果

1.培養条件下における細胞分裂の日周性

G. nagasakiense の細胞分裂は，各光強度条件下において，明瞭な日周性を示した（Fig. 5-2)。2 核細胞は Fig. 5-1 B と F に示したような細胞だけでなく，同一細胞内における2核の

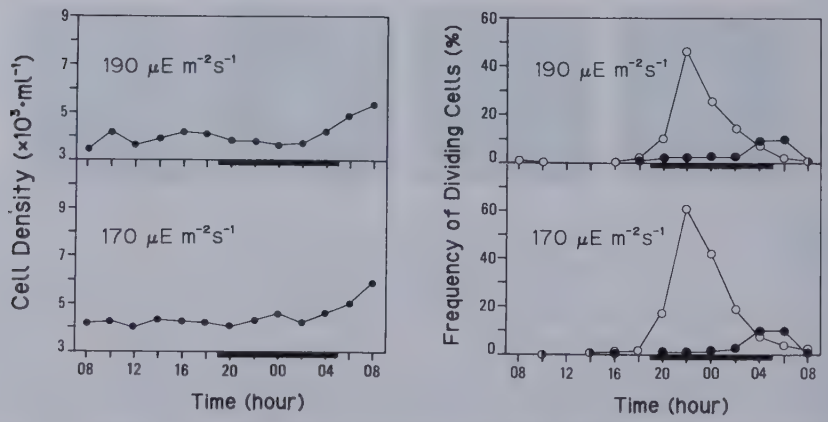


Fig.5-2. Changes in cell density (left) and diel patterns of frequency of dividing cells (right) in cultured *G. nagasakiense* under different light intensities (170 and 190 μE $m^{-2}s^{-1}$). Open and closed circles in the right column indicate 2 nuclei and paired cells, respectively. Dark bars represent the dark period of the L:D cycle.

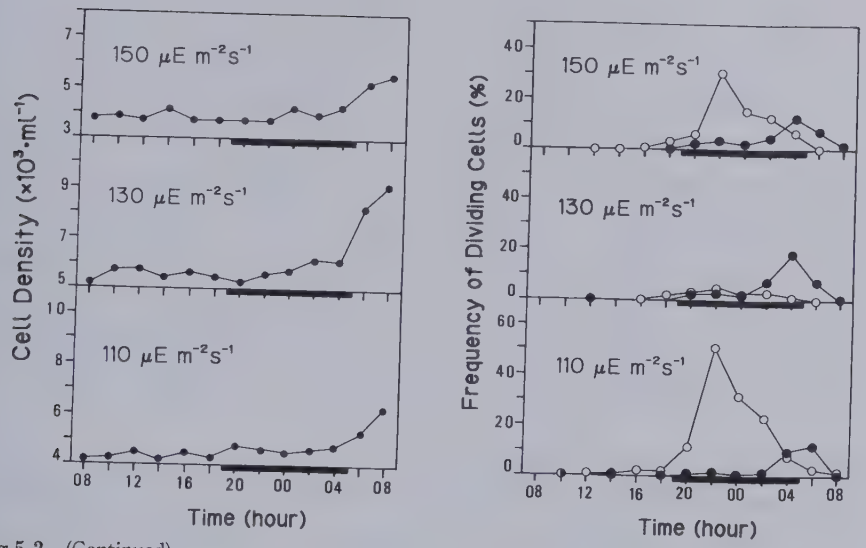


Fig.5-2. (Continued).
Light intensities (110～150 μE $m^{-2}s^{-1}$).

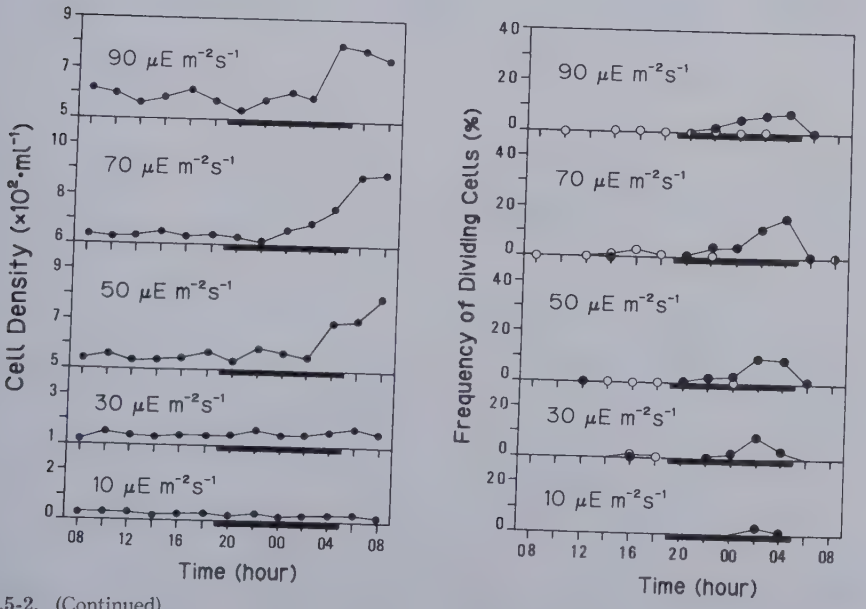


Fig.5-2. (Continued).
Light intensities (10～90 μE $m^{-2}s^{-1}$).

大きさが相当異なる場合もあった。しかし，それらも2核細胞に属するものとして計数した。光強度が110 μE m^{-2}s^{-1}以上では，2核細胞は16:00より増加し始め，その出現頻度は22:00に最大となった（Fig. 5-2）。光強度110 μE m^{-2}s^{-1}から190 μE m^{-2}s^{-1}の各培養における2核細胞の最大頻度は，それぞれ51，4.7，30，61及び46%であった。2核細胞の出現頻度は22:00以降急激に減少し，明期開始後1時間で見られなくなった。一方，分裂細胞は暗期の開始時から出現し始め，04:00から06:00の間に最大の出現頻度を示した。光強度110 μE m^{-2}s^{-1}から190 μE m^{-2}s^{-1}の各培養における最大出現頻度はそれぞれ12.8，18.6，12.8，9.9及び9.5%であった。またこの時間帯は細胞数の増加期と一致した。光強度90 μE m^{-2}s^{-1}以下の場合，2核細胞の出現頻度は3%以下まで大きく低下した（Fig. 5-2）。また最大出現頻度の時間が早まり，暗期に入る前に移行する傾向がみられた。光強度が10 μE m^{-2}s^{-1}の場合，2核細胞は観察できなかった。一方，分裂細胞は最大頻度の出現が約2時間早くなったが，110 μE m^{-2}s^{-1}以上の場合と基本的に同様の出現傾向を示した。光強度10～90 μEm^{-2}s^{-1}における分裂細胞の最大出現頻度は，それぞれ3.3，8.5，9.9，15.9及び8.0%であった。

2.光制御培養条件下におけるT_dの測定

G. nagasakiense の細胞分裂は，Fig. 5-1 A～Hに示す順序で進行した。2つの分裂段階，すなわち2核細胞と分裂細胞のFDCに基づいて計算したT_dと増殖速度（μ）との関係をFig. 5-3に示す。2核細胞の場合T_dは1.79±2.01 h（平均±標準偏差）と変動が大きく，特にμが0.5 divisions day^{-1}付近で変動が大きかった。一方，分裂細胞の場合T_dは1.09±0.16 hであり，μが0.2～0.8 divisions day^{-1}の範囲でほぼ一定であった。このことから光強度によって増殖速度を制御した場合T_dはほとんど変化しないことが判明した。FDC法により増殖速度の推定を行う

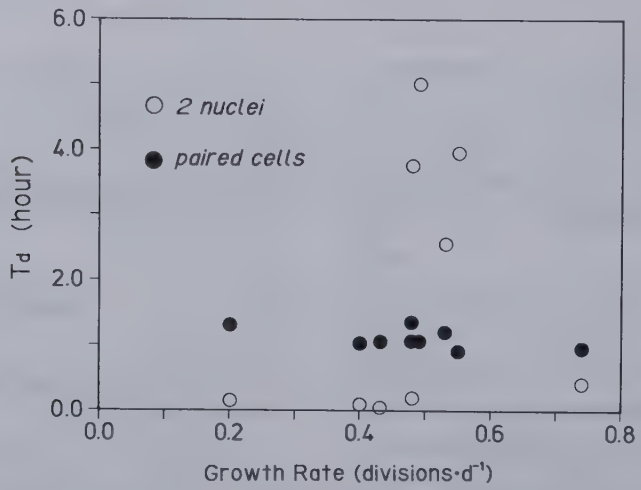


Fig.5-3. Relationship between duration of division stages (T_d) and growth rate of *G. nagasakiense* grown under different light intensities (10 to 190 μE m^{-2}s^{-1}). T_d was calculated from two division stages; i.e., 2 nuclei and paired cells.

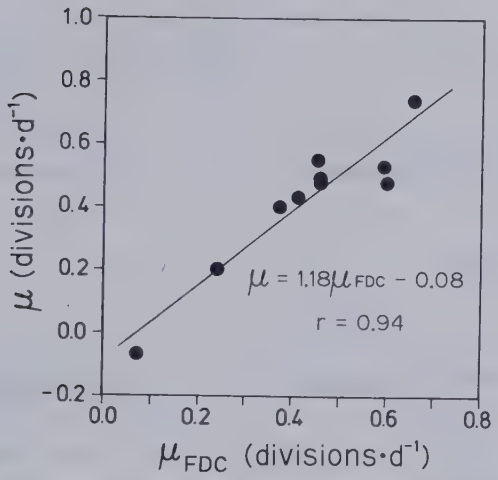


Fig.5-4. Relationship between growth rate estimated by the FDC technique (μ_{FDC}) using laboratory derived T_d value (1.09 h) and that calculated from increase in cell number (μ).

際には，環境の変化に対して T_d が一定である必要がある（CAMPBELL and CARPENTER 1986）。したがって，2核細胞から求めた T_d は増殖速度の計算には用いることができないと判断されたので，以下の計算には分裂細胞について得られた T_d を用いた。T_d = 1.09 h として FDC によって計算した平均増殖速度（μ_{FDC}）と，細胞数に基づいて計算した増殖速度（μ）との間には次式で示される直線関係（$r=0.94$, $p<0.001$, $df=8$）が認められた（Fig. 5-4）。

$$\mu = 1.18\mu_{FDC} - 0.08$$

このことは，T_d が一定であれば分裂細胞の FDC によって *G. nagasakiense* の平均増殖速度が推定できることを示している。なお，2核細胞から求めた T_d を用いた場合には，このような相関関係は得られなかった。

3. T_d に及ぼす温度の影響

分裂細胞の FDC から得られた T_d によって平均増殖速度が推定可能であることが判明したことから，以下の検討は分裂細胞の T_d について行った。明暗周期14hL:10hD の下で，10℃から30℃の5段階の温度で培養した *G. nagasakiense* における分裂細胞の出現の日周変化を Fig. 5-5に示す。なお明暗周期12hL:12hD で行った実験からも同様の結果が得られた。15℃以上において分裂細胞の出現は顕著な日周性を示した。分裂細胞は暗期の開始頃から増加し始め，04:00から06:00に最大となり，それ以降急激に減少した。一方10℃では低頻度ながら終日分裂細胞の出現が認められたが，最大出現頻度は15℃以上の場合と同様に明期開始時の06:00に見られた。各温度で培養した *G. nagasakiense* の T_d と，培養温度との関係を Fig. 5-6に示す。2回の実験の結果，T_d の対数値と温度（T）との間には，有意な負の相関関係（$r=-0.92$;

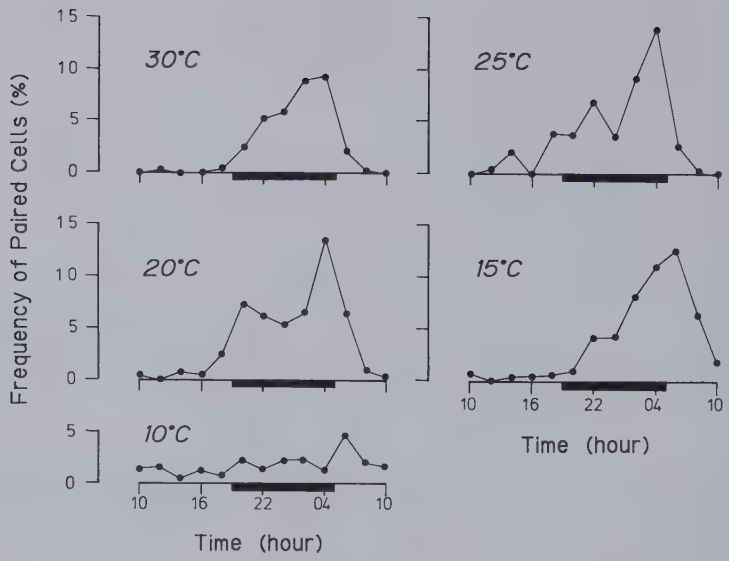


Fig.5-5. Diel patterns of frequency of paired cells in cultured *G. nagasakiense* at various temperatures. Dark bars represent the dark period of the L:D cycle.

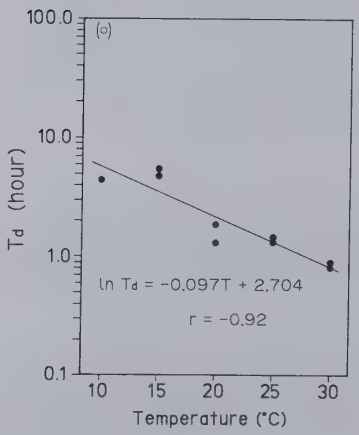


Fig.5-6. Effect of temperature (T) on duration of division stage (T_d) for laboratory cultured *G. nagasakiense*. One open circle in the parentheses was omitted from calculation of the regression equation.

$p<0.001$, $df=7$) のあることが判明した；

$$\ln T_d = -0.097T + 2.704 \qquad (4)$$

以上の結果から，温度の上昇に伴い T_d は指数関数的に減少することが明らかとなった。また T_d が温度の関数として表されることから，(4) 式を用いることによって任意の温度における T_d が推定可能になった。

考　察

培養条件下における *G. nagasakiense* の細胞分裂は特定の時間帯に集中して起こる，すなわち本種は同調的細胞分裂（phased cell division）を行っていることが明らかとなった（Figs. 5-2と5-5）。種々の微細藻類の細胞分裂は，培養条件下及び現場海域で同調的に起こることが報告されており（CHISHOLM 1981），渦鞭毛藻では，*Amphidinium carterae*（CHISHOLM and BRAND 1981），*Ceratium* 属（ELBRÄCHTER 1973，TORIUMI 1976，WEILER and CHISHOLM 1976，WEILER and EPPLEY 1979，ELSER and SMITH 1985），*Exuviella cordata* と *Prorocentrum micans*（STOLBOVA *et al.* 1982），*Gonyaulax polyedra*（SWEENY and HASTINGS 1958），*Gyrodinum aureolum*（CHANG and CARPENTER 1985，DAHL and BROCKMANN 1985），*Peridinium cinctum* f. *westii*（POLLINGHER and SERRUYA 1976），*Pyrocystis* spp.（SWIFT and DURBIN 1972）及び *Pyrodinium bahamense*（BUCHANAN 1968，MACLEAN 1977）などの種類で部分的同調分裂が報告されている。しかし，種によって分裂の盛期は異なっているようである（CHISHOLM and BRAND 1981）。

飯塚・峯（1983）は，12hL:12hD の明暗周期で *G. nagasakiense* を培養した場合，暗期開始後6時間目から3時間以内に分裂が集中したと述べている。彼らは核分裂の観察は行っていないが，分裂細胞を下錘体左下端部が伸張し始めた状態から分離する直前までと規定している。この時間帯（本実験では01:00～04:00に相当）は，本研究の実験では2核細胞のピークより後で，分裂細胞の最大出現時間の直前に相当した。また，小野（1988）は核分裂中の細胞の出現ピークは暗期の4～7時間目頃に見られると報告している。したがって，本研究結果はこれらの観察結果とほぼ一致したと見なすことができる。

G. nagasakiense の増殖最適温度である25℃（第IV章 Fig. 4-4）における T_d は（4）式から1.3 hと計算される。この値は，*Ceratium* 属で報告されている2～3 h（WEILER and CHISHOLM 1976，ELSER and SMITH 1985）より短く，*Gyrodinium aureolum*（CHANG and CARPENTER 1985）の27 min の約3倍であった。*Ceratium* 属では分裂過程を詳細に観察し，核分裂から細胞質分裂の終了までの時間から T_d が求められている（ELSER and SMITH 1985）。しかし，分裂の開始や終了が明瞭でない場合には，培養実験を通して細胞数による増殖速度と FDC から（1）式を解いて T_d を求める必要がある（CHANG and CARPENTER 1985，CAMPBELL and CARPENTER 1986）。このように，種類や観察した分裂段階並びに推定法の違い，さらには培養温度等が T_d に影響するようである。したがって，FDC 法によって増殖速度を推定する際には，T_d の算出について十分な検討を行う必要がある。

2核細胞の FDC より求めた T_d は，分裂細胞について求めたものに比べ変動が大きかった。さらに，この T_d を用いて計算した μ_{FDC} と増殖速度（μ）との間に相関も認められなかった。この原因の一つには，同一細胞内に大きさの異なる2核が観察された場合でも，それを2核細胞として計数したことによる観察上の誤差が挙げられる。特に Fig. 5-1 B と F に示したような細胞の縦軸と直角に分裂面が見られるものの多くは間期（G_1期）核内における染色体の不均一分布に

よる可能性が考えられる（PARTENSKY 私信）。2核細胞と分裂細胞における FDC の差（Fig. 5-2）もそれに起因しているものと思われる。したがって細胞核の DNA 定量によって，大きさの異なる2核を有する細胞が細胞周期のどの段階に属するかを今後正確に特定する必要がある。

McDUFF and CHISHOLM（1982）は，試料の採集間隔 T_s が分裂時間 T_d と大きく異なる場合 FDC 法による平均増殖速度の推定値に誤差が生じ，特に T_s が T_d より長い場合にはその誤差が大きくなることを示した。本研究においては T_s を2hとしたため，(4) 式より20℃以下では T_s は T_d より短く誤差は小さいはずである。しかし，それ以上の温度では，例えば30℃の T_d は 0.8 h と計算されるように，T_s が T_d を上回り，誤差が大きくなる可能性がある。したがって，水温20℃以上で FDC 法を用いる際には採水間隔（T_s）を1時間程度に短縮することが望ましい。

G. nagasakiense の増殖速度を光によって制御した場合には T_d は一定であったが，それを温度で制御した場合，温度の下降につれ T_d は指数関数的に増大した。このことは，*G. nagasakiense* の細胞周期の各段階（G_1 期，S 期，G_2＋M 期）に及ぼす影響が光と温度では異なることを示唆している。特に，温度が T_d に影響を及ぼすという結果は，*Ceratium* 属の核分裂時間が，温度の低下とともに長くなるという WEILER and EPPLEY（1979）の観察と一致するものである。

FDC 法によって増殖速度を推定する際には，いくつかの条件が満たされる必要がある。第1に環境条件によって T_d が左右されないこと，第2に個体群中のすべての細胞の T_d が同じであること，第3に個体群中のすべての細胞が増殖能を有していることである（CAMPBELL and CARPENTER 1986）。まず第1の T_d の安定性の問題であるが，本研究で明らかになったように光強度は T_d に影響を及ぼさなかった。一方，温度は T_d に顕著な影響を与えたが，両者の関係が (4) 式で示した指数関数で表せることが判明した。したがって，FDC 法を現場個体群に応用する際には現場温度における T_d を求め，それを用いることによって温度の影響を考慮に入れることが可能になった。

G. nagasakiense の場合，培養条件下における分裂細胞の出現パターンはほぼ一定であり，常に暗期の終わり頃に集中して見られることが判った（Figs. 5-2と5-5）。したがって，T_d は個体群中の細胞間でほとんど一定であり，第2の問題は起こっていないものと考えられる。

現場海域における *G. nagasakiense* 個体群中の細胞が，すべて増殖能を有しているか否かは現時点では不明である。しかし，増殖能力を持たない細胞の割合が多いとFDC法による増殖速度の推定値は過小評価となることが指摘されているので（HAGSTRÖM *et al.* 1979），この問題が FDC 法に及ぼす影響については今後検討して行く必要がある。

本研究で使用した DAPI 染色は，操作が非常に簡便であり，蛍光顕微鏡によって個々の分裂細胞（核分裂を含む）を容易に観察できること，バックグラウンド蛍光がほとんど無いため洗浄等の作業が不要であること，固定試料を用いた観察が可能であること等の利点を有する。また，FDC 法は瓶培養を必要としないため，培養期間に生じる栄養塩の枯渇等様々な問題を全く

考慮する必要がない。さらに特定の種ごとの増殖速度が推定できることから，本手法は現場における *G. nagasakiense* 個体群の増殖速度の測定に極めて有効な手段であると考えられる。したがって，FDC 法による増殖速度測定法は赤潮の短期予知手法としての実用化が期待される。

第 2 節　現場海域における同調分裂と増殖速度

前節では，FDC 法によって室内培養条件下における *G. nagasakiense* の平均増殖速度が測定可能であることを示した。しかし，自然条件下では様々な環境因子が複雑に関連しながら増殖に影響を及ぼしていると考えられる。そのため，FDC 法を *G. nagasakiense* の現場個体群に応用するには，本種がその前提条件である同調的細胞分裂を行っているか否かをまず明らかにしておく必要がある。本節では異なる 2 海域（周防灘及び広島湾）において計 3 回の現場調査を実施し，*G. nagasakiense* の自然個体群が同調的細胞分裂を行なっていることを確認するとともに，FDC法による平均増殖速度を推定した。

材料及び方法

1. 周防灘における現場調査

調査は周防灘に設けた定点 St.2 (Fig. 5-7) で，1987年 8 月 8 日～9 日に南西海区水産研究所調査船「しらふじ丸」によって実施した。8 月 8 日の午前10:00から，24時間にわたり2時間ごとに定点の 0 m，5 m，海底上 1 m（B-1m）層よりバンドーン採水器により採水を行った。試水250 m*l* をポリカーボネートメンブランフィルター(Nuclepore 社，径47 mm，孔径 3 μm)を用いた吸引濾過濃縮法（板倉他 1990）により10 m*l*に濃縮した。濃縮した植物プランクトン試料に等量の 1 %グルタールアルデヒド海水溶液を加えて固定後，DAPI溶液を最終濃度で 1 μg

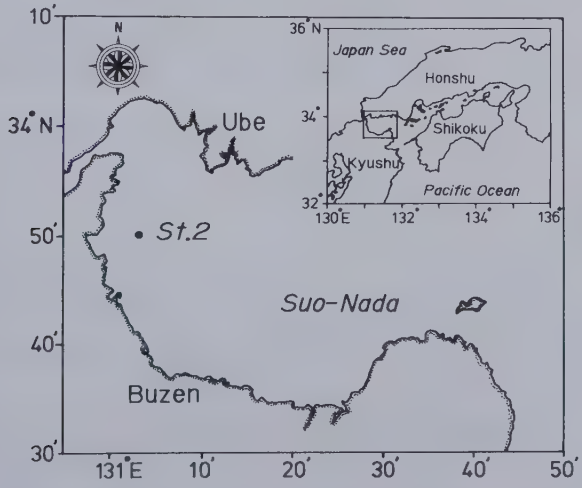


Fig.5-7. Location of the sampling station (St.2) in Suo-Nada, western Seto Inland Sea.

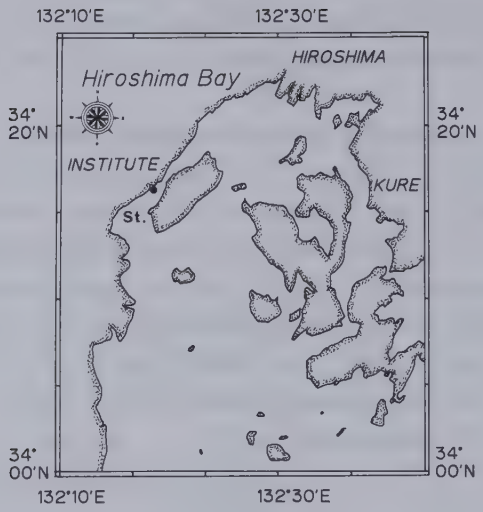


Fig.5-8. Location of the sampling station in Hiroshima Bay.

ml^{-1}となるように添加して核染色を行い検鏡に供した。各時刻に得られた試料についてそれぞれ200細胞以上検鏡し，前節の(2)式にしたがってFDCを求めた。各採水時刻における各層水温の測定結果から前節の（4）式よりT_dを計算し，(1)式から平均増殖速度μ_{FDC}を求めた。

2.広島湾における現場調査

調査は広島湾に設けた定点(Fig. 5-8)で1989年9月12～13日及び1990年9月17～18日の2回実施した。午前10:00（1989年調査）あるいは正午（1990年調査）から24時間にわたり0m，2m及び4m(1990年調査では0，2m層のみ）より採水し，ガラス繊維濾紙(Whatman GF/C, ϕ150 mm）によって2～3literを50ml程度に濃縮した。濃縮試料は前節の方法で固定後Utermöhlの沈澱法によってさらに10mlまで濃縮した。以後の染色及び検鏡方法は周防灘調査に準じた。

結　果

1.周防灘における調査

1987年8月8日～9日の周防灘の定点における*G. nagasakiense*の分裂細胞の割合の日周変化をFig. 5-9に示す。分裂細胞の出現頻度は，20:00から増加し始め，5m層では22:00に，またB-1m層では02:00にそれぞれ5%及び3.3%の最大出現頻度を示した後に減少した。ただし0m層では*G. nagasakiense*がほとんど分布しなかったため計数はできなかった。この結果から，周防灘における*G. nagasakiense*個体群が部分的同調分裂を行っていることが明らかとなった。調査時の定点における水温は，5m層及びB-1m層で，それぞれ25.9℃と23.9℃であった。この温度から前節の（4）式によってT_dを求めると，それぞれ1.21h及び1.47hと計

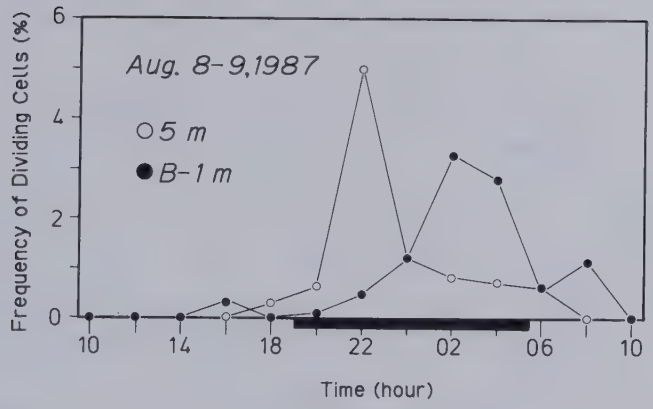


Fig.5-9. Diel pattern of dividing cells in the natural population of *G. nagasakiense* in Suo-Nada. Night period is indicated by blackened bar on the abscissa.

算され，この T_d を用いて前節の（1）式から平均増殖速度を計算した結果，5 m 及び B-1m 層でそれぞれ0.14及び0.12 divisions day^{-1}の値が得られた（Table 5-1）。

2.広島湾における調査

1989年 9 月の広島湾における *G. nagasakiense* 個体群の分裂細胞の出現割合の日変化を Fig. 5-10に示す。本調査でも *G. nagasakiense* 個体群が明瞭な同調的細胞分裂を行っていることが判明した。すなわち，昼間には分裂中の細胞はほとんど観察されなかったが，日没から約 2 時間後の20:00からその割合が増加し始め，2 m以深では02:00に，また 0 m では04:00に最大出現頻度を示した後，08:00にはほとんど見られなくなった。分裂細胞の最大出現頻度は0，2，4 m でそれぞれ6.5，5.2及び6.9%であった。この調査時における各層水温，T_d 及び μ_{FDC} を Table 5-1に示す。μ_{FDC} は 0 m，2 m 及び 4 m 層でそれぞれ0.40，0.27，0.36 divisions day^{-1}であった。

1990年 9 月の調査結果を Fig. 5 11に示す。本調査でも1989年調査とほぼ同様の分裂細胞の出現パターンが見られた。ただし 0 m 層における出現頻度は20:00から04:00にかけてほぼ

Table 5-1. In situ growth rates of *G. nagasakiense* estimated by FDC technique.

Locality	Date	Depth (m)	Water Temp. (℃)	T_d (h)	μ_{FDC} (div. d^{-1})
Suo Nada	1987 Aug. 8-9	5	25.9	1.21	0.14
		B-1	23.9	1.47	0.12
Hiroshima Bay	1989 Sep. 12-13	0	26.1	1.19	0.40
		2	25.5	1.26	0.27
		4	24.8	1.35	0.36
Hiroshima Bay	1990 Sep. 17-18	0	24.9	1.33	0.29
		2	25.0	1.32	0.52

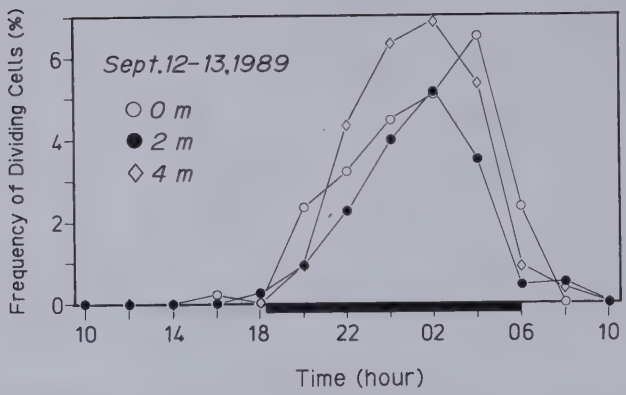


Fig.5-10. Diel pattern of dividing cells in the natural population of *G. nagasakiense* in Hiroshima Bay in 1989. Night period is indicated by blackened bar on the abscissa.

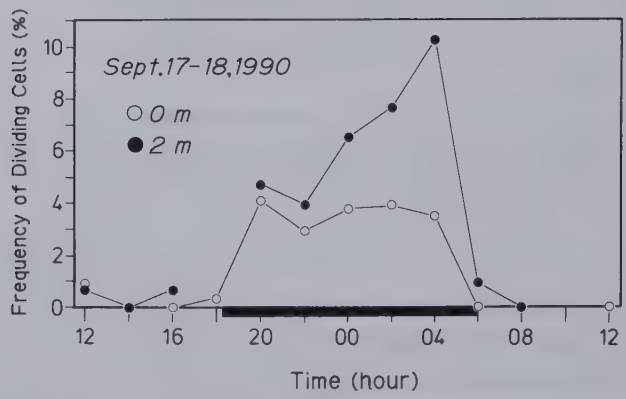


Fig.5-11. Diel pattern of dividing cells in the natural population of *G. nagasakiense* in Hiroshima Bay in 1990. Refer to Fig.5-10 for other legends.

3.5%前後で等しく，そのため出現の盛期は明瞭でなかった。しかし，2 m 層では04:00に10.2%の明瞭な出現ピークが認められた。本調査では特に 0 m 層で細胞密度が極めて低く，FDC を求められなかった試料もあった。しかし，2 m層における18:00を除いて，それらの試料は細胞分裂がほとんど観察されない昼間のものであったため，他調査と同様にμ_{FDC}を計算した(Table 5-1)。その結果，各層のμ_{FDC}は 0 m 層が0.29 divisions day^{-1}，2 m 層が0.52 divisions day^{-1}であった。ただし，2 m 層の結果については先の理由から過小推定の可能性がある。

考　察

現場海域における *G. nagasakiense* 個体群の細胞分裂も，前節で述べた室内培養同様，同調的に起こっていることが周防灘及び広島湾の調査で明らかになった。現場海域における分裂盛期

は，周防灘では22:00～02:00に（Fig. 5-9），広島湾では02:00～04:00に観察された（Figs. 5-10と5-11）。これらの結果を総合すると，本種は深夜から早朝にかけて分裂する種類と判断される。

G. nagasakiense 現場個体群における分裂盛期の時刻は前節で述べた培養株のそれよりも2～4時間早かった。周防灘で得られた結果は光強度が弱い5 m以深の個体群についてのものであり，また広島湾の調査では2回とも雨天のため日照時間は不照あるいは3時間と極めて短かった（広島地方気象台 1989,1990）。培養条件下でも低光強度のもとでは分裂盛期が早まる傾向が見られており（Fig. 5-2），このような分裂盛期の時間的ずれは現場と室内における光強度の差に起因するものと考えられる。以上の結果から，FDC法による増殖速度測定の前提条件である同調的細胞分裂が現場個体群についても確認された。さらに分裂細胞の出現がほぼ夜間のみに限られていたことから，FDCの測定を夜間のみに限定しても増殖速度の測定値自体には大きな誤差は生じないと考えられる。このように試料採集回数を減らすことができれば，現場調査及び検鏡作業の軽減が図られ，迅速に測定結果を得ることが可能になろう。

FDC法で得られた *G. nagasakiense* 個体群の増殖速度は周防灘では0.12と0.14 divisions day^{-1}，広島湾では0.27～0.52 divisions day^{-1}であった（Table 5-1）。これらの値は，第IV章及び飯塚・峯（1983）で示された培養条件下における本種の最大増殖速度（1.0 division day^{-1}）に比べるとかなり低い。飯塚（1987）は，大村湾における *G. nagasakiense* の平均増殖速度をチューブ採水法によって水柱ごとに求め，赤潮前の表層個体群では最大1.0 division day^{-1}の増殖速度が得られたとしている。それに対して，中層及び底層個体群における増殖速度はかなり低く，0.55～0.49 divisions day^{-1}に留まったことから，全水柱当りでは0.59 divisions day^{-1}という値が示されている。また，Honjo *et al.*（1990）は五ヶ所湾における *G. nagasakiense* の平均増殖速度として0.32～0.47 divisions day^{-1}という値を報告している。したがって，FDC法によって広島湾で得られた増殖速度は大村湾あるいは五ヶ所湾で得られた結果とほぼ一致している。これらの結果から，非赤潮時の *G. nagasakiense* 現場個体群が本種の最大増殖速度を示すことはまれで，通常はそれよりもかなり低い速度で増殖しているものと考えられる。

一方，周防灘における平均増殖速度は広島湾に比べても低かった（Table 5 1）。周防灘の調査期間の日出と日没から明暗周期を求めるとほぼ14hL:10hDであり，前節でT_dを求めた実験条件と等しい。また，光強度はT_dに影響しないことが判っており，さらにT_dは前節の(4)式に現場水温を代入して求めている。ただし周防灘におけるFDCは最大5％で，前節で述べた培養個体群での値に比べ低かった。以上のことから，この低い増殖速度は方法論上の問題に起因するものではないと結論できる。大村湾では表層個体群にくらべて，中層及び底層個体群の増殖速度はかなり低いことが報告されている（飯塚 1987）。周防灘の測定値も，5 m層以深の中・底層個体群について得られたものであり，光あるいは栄養塩濃度等の影響によって増殖が制限されていた可能性が考えられる。第III章で述べたように1985年から周防灘全域を対象に行った調査結果によれば，大規模な *G. nagasakiense* 赤潮が発生した1985年や，一部赤潮状態となった1986年に比べ，本調査が行われた1987年には *G. nagasakiense* の増殖はほとんど見ら

れなかった。実際，1987年の周防灘西部海域では，本種の赤潮の発生は一件も記録されておらず，本種の増殖速度が極めて小さかったことも，その要因の一つであると考えられる。

現場海域において動物プランクトン等による捕食圧が分裂中の細胞に対して集中的に加わると，FDC法による増殖速度は過小推定となる（CHISHOLM 1981）。事実，珪藻 *Ditylum brightwellii* の分裂細胞が橈脚類によって選択的に捕食されることや（RICHMAN and ROGERS 1969），橈脚類の摂食行動が植物プランクトンの分裂盛期である夜間に活発に行われることが報告されている（STEARNS 1986）。現場海域における *G. nagasakiense* でも分裂細胞が夜間に集中して見られることから（Figs. 5-9～5-11），動物プランクトン等の摂食活動が過小推定の原因になる可能性もある。しかし，*G. nagasakiense* を捕食する橈脚類は少ないという実験結果も得られており（UYE and TAKAMATSU 1990），選択的な捕食圧が増殖速度の測定に及ぼす影響については今後検討する必要がある。

以上述べてきたように，FDC法で求めた *G. nagasakiense* 現場個体群の増殖速度は綿密な調査で得られたこれまでの測定結果とほぼ一致することが判明した。このことはFDC法が増殖速度推定法として有効であることを示している。また，現場海域における *G. nagasakiense* 個体群の増殖速度が小さい場合，結果として赤潮の発生は認められておらず，これは増殖速度が赤潮予知の指標となり得ることを傍証するものであろう。

第Ⅵ章　*Gymnodinium nagasakiense* の細胞周期

細胞が分裂しながら増殖している際には，DNAを始めとする細胞構成要素を倍加する反応が繰り返し進行している。その過程は新生した娘細胞が生長・分裂して再び娘細胞を生じる過程であって，このような一連の過程を細胞周期と呼ぶ（広川 1977）。真核生物の細胞周期はDNA合成期（S期）と細胞分裂期（M期）という2つの主要な段階から構成されており，さらにS期の前後には G_1期と G_2期と呼ばれる間期（Gap）がある（PUISEUX-DAO 1981）。

赤潮の発生機構を考える上で赤潮生物の生活史を明らかにすることは重要な課題である。第Ⅲ章で述べたように，浦ノ内湾では *Gymnodinium nagasakiense* の栄養細胞が周年にわたり観察された。一方，第Ⅳ章の室内実験から，本種が瀬戸内海における年間の最低水温に近い10℃でも増殖できることが判明した。さらに，海底泥試料を培養しても栄養細胞が出現しないことも報告されている（板倉他 1990）。以上の結果は，夏期の赤潮のシードポピュレーションとして越冬した栄養細胞が重要であること，さらに本種は生活史にシストを持たない可能性が大きいことを示している。しかし，変動する環境に適応して行くためには接合によるDNAの組み替えを行ってheterogeneityを保持することが必要であると考えられることから（左子・有田 1986），シストが存在しなくても有性生殖過程が存在する可能性がある。実際に渦鞭毛藻のシストは有性的に形成されるのか無性的に形成されるのか明らかでない種も多く（中原 1986），さ

らに有性生殖がシストの形成を伴わない場合もある（ZINGMARK 1970, 内田 1991）。このような有性生殖過程を含む生活史を明らかにするためには，それらの各段階における核相を調べることが重要である。しかし，一般に渦鞭毛藻の染色体を計数することは，それらの染色体数が多数であり，さらに通常の押しつぶし法では観察しにくいことから，困難な作業である（LOPER *et al.* 1980, HOLT and PFIESTER 1982）。さらに染色体の計数には細胞を破壊する必要があるため，種々の植物プランクトン種が混在する天然試料にはほとんど使用できない。それゆえ，染色体数の計数に代わるものとして，一細胞ごとの核DNA量を簡便に測定する手法を確立し単相と複相を識別可能にすることは，*G. nagasakiense* の生活史を解明する上で極めて有効であると考えられる。

第Ⅴ章では，*G. nagasakiense* 赤潮の発生を予知するための生物学的な指標として種の増殖速度に着目し，細胞分裂指数（FDC: Frequency of Dividing Cells）によるその推定法について述べた。分裂期（M 期）は細胞周期の中の重要な段階の一つであるため，分裂指数法の基礎を固める上で本種の細胞周期を明らかにしておく必要がある。さらに，ごく最近細胞周期解析に基づく増殖速度の測定法が開発されてきている（CARPENTER and CHANG 1988, CHANG and CARPENTER 1988）。この手法は分裂指数法に比べて測定精度が高いこと，そして試料採取頻度が少なくて済むなどの利点を有している。しかし，この手法を *G. nagasakiense* の場合に応用するためにも，その細胞周期に関する基本的な情報が不可欠である。

以上のような背景から，本章では赤潮の発生予知及び生活史解明のための基礎資料を得るため，*G. nagasakiense* の細胞周期を明らかにすることを目的とした。まず第 1 節では顕微蛍光測光による核 DNA 量の測定法を確立し，第 2 節ではその手法を用いて培養条件下における本種の細胞周期を明らかにした。さらに，第 3 節では細胞周期に及ぼす温度の影響を調べ，第 4 節では現場個体群における細胞周期を明らかにした。

第 1 節　核 DNA 量測定法の確立

細胞が分裂し増殖するには DNA の合成が必要である。このように DNA 量は細胞の成熟度の指標であることから，DNA 分布から細胞周期解析を行うことができる（高橋 1983）。従来の細胞周期解析では放射性チミジン（[^{3}H]-TdR）を用いたオートラジオグラフィーによる分裂指数法（labeled mitotic index）や 2 重標識法が用いられてきた（団 1981）。しかし，これらには多大な労力を要すること，放射性同位元素の使用が不可欠であること等，日常的な使用には困難が伴う。近年それに代わるものとしてフローサイトメトリー（Flow Cytometry）が登場し，細胞生物学の飛躍的進歩に貢献している（太田 1988）。そのため，オートラジオグラフィーによる細胞周期解析は次第に過去のものとなりつつある（高橋 1983）。しかし，フローサイトメトリーでは機器自体がかなり高額であるため，植物プランクトン分野におけるその利用は未だ一般的にはなっていない。顕微蛍光測光法（Microfluorometry）はフローサイトメトリーに比べ測定に長時間を要する反面，個々の細胞を直接検鏡でき，さらに操作も容易である

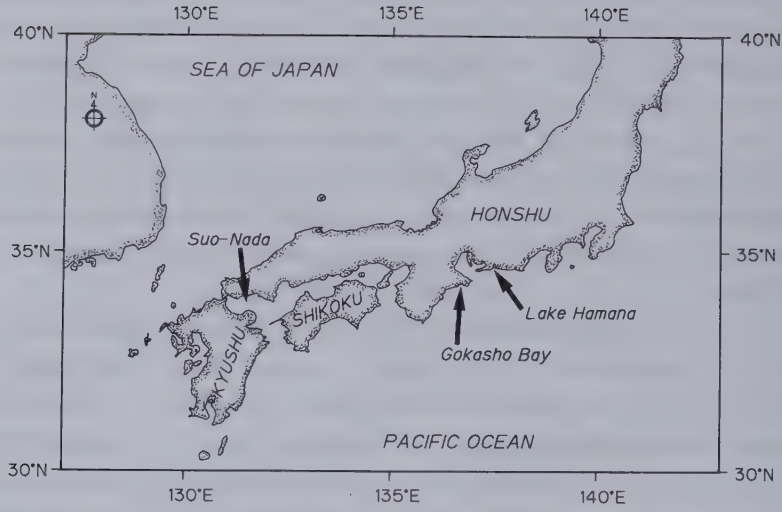


Fig.6-1. Locations of sampling areas. An axenic culture of *G. nagasakiense* was isolated from Suo-Nada in July 1985, and living cells from natural populations were obtained in June (Gokasho Bay) and July (Lake Hamana), 1990.

等の利点を有する。そこで本節では，顕微蛍光測光によって *G. nagasakiense* の細胞当りの DNA 量を測定するための方法を確立することを目的とした。

材料及び方法

1. 供試株と培養条件

培養実験に用いた *G. nagasakiense* は1985年に瀬戸内海西部の周防灘（Fig. 6-1）から分離し無菌化したクローン株（G303 AX-2）である。培地には改変 SWM-3（CHEN *et al.* 1969, 伊藤・今井 1987）を用い，培養は温度22℃，光強度100 μE $m^{-2}s^{-1}$，明暗周期は14hL:10hD で行った。さらに，培養細胞と天然細胞における核DNA量の相違を調べるため三重県五ヶ所湾及び静岡県浜名湖（Fig. 6-1）より採取した海水試料中の *G. nagasakiense* 細胞を用いた。

2. 核DNA測定試料の調製

10 m*l* 容のガラス製ねじ口遠心管中に *G. nagasakiense* の培養 5 m*l* を入れ，それに等量の1％グルタールアルデヒド海水溶液を加えて細胞の固定を行った。固定試料は分析まで冷蔵庫（4℃暗条件）に保存した。固定試料を遠心分離（200×g，15 min）し，その上澄みを捨てた。核 DNA 測定時におけるクロロフィルの影響を調べるため，遠心後の細胞ペレットに 4℃の冷却メタノール（99%）を 5 m*l* 加え，4℃で一晩クロロフィルの抽出を行った（OLSON *et al.* 1983）。遠心分離（200×g，15 min）によってメタノールを除去した後，細胞ペレットに 4℃の Tris 緩衝液（10 mM Tris, 10 mM EDTA-2Na, 100 mM NaCl, 10 mM 2 mercaptoethylamine hydrochloride, pH＝7.4）（HAMADA and FUJITA 1983）を 5 m*l* を加えて再懸濁させ，再び

遠心分離（200× g，15 min）して細胞の洗浄を行った。その後，細胞ペレットに上述の Tris 緩衝液に溶解させた4', 6-diamidino- 2-phenyl indole（DAPI）を 5 m*l* 加え，4 ℃の暗条件下で染色を行った。

染色に最適な DAPI 濃度を明らかにするため，細胞を種々の DAPI 濃度（0.005～5 μg ml^{-1}）の下で染色し蛍光強度を比較した。さらに最適染色時間及び染色細胞の蛍光寿命を検討するため，DAPI 染色後に 4 ℃の暗条件下で保存した細胞について，最大39日にわたり蛍光強度の経時変化を調べた。

3. 顕微鏡蛍光測光

染色が終了した細胞を遠心分離（200×g，15 min）によって濃縮し，細胞懸濁液数滴をパスツールピペットで無蛍光スライドガラス上に落し，カバーグラスで封入した。細胞核の蛍光強度は落射蛍光顕微鏡（Olympus BHS-RFC）と顕微蛍光測光装置（Olympus OSP-1）の組み合せにより測定した。各フィルターの組み合せは以下のように設定した。励起フィルターは UG-1（380 nm），バリヤフィルターは L430（435 nm），ダイクロイックミラーは DM400＋L 420，測光フィルターは MF450W とした。励起光源には100W 水銀ランプ（OSRAM HBO 100 W/2）を用いた。検鏡は倍率200倍で行った。個々の細胞を視野中に設けた直径40 μm の蛍光測定用ピンホール内に入れ，その核の蛍光強度を測定した。蛍光値の標準化には径4.29 μm の蛍光標準粒子（Fluoresbrite carboxylate microspheres，蛍光波長＝468 nm，Polyscience 社）を使用した。測光データは接続しているコンピュータに転送され，そこで蛍光値の平均及び標準偏差を計算するとともに，DNA ヒストグラムを出力させた。なお，核 DNA 量は染色体分析による結果（たとえば1n あるいは2n）と区別するため，染色体数に相当する DNA 量，すなわち1C（one complement of DNA）あるいは2C（two complements of DNA）で示した。

結　果

メタノール処理（クロロフィル除去）が DAPI 染色を行った *G. nagasakiense* の細胞核から発せられる蛍光強度に及ぼす影響を Fig. 6-2に示す。まずメタノール無処理区では一つの幅広いピークのみが得られた。このピークの変動係数（Coefficient of variation: CV）は31％と非常に大きかった。ところが，メタノール処理区では二つのピークが明瞭に認められた。これらのピークのうち，DNA 量の少ないピークは細胞周期の G_1期の細胞（1C DNA）で，もう一方の DNA 量の多いピークは同じく G_2＋M期の細胞（2C DNA）で構成されていると見なされる。また複相核の平均蛍光強度は単相のそれのほぼ2倍であった。それら各々のピークの CV はそれぞれ3.5と3.4％であった。さらに，メタノール無処理区に比べて，ほぼ2倍の蛍光強度が得られることが判明した。以上の結果から，細胞内のクロロフィルは DNA-DAPI 複合体からの蛍光強度を減少させることが明らかとなった。

核染色に最適な DAPI 濃度を検討した結果を Table 6-1に示す。DAPI 濃度0.005～0.5 μg ml^{-1}の範囲では，その濃度の増加にしたがって G_1及び G_2＋M の各ピークとも蛍光強度の増加が認められた。ただし低DAPI濃度における蛍光強度の変動係数CVは８％以上と大きかった。

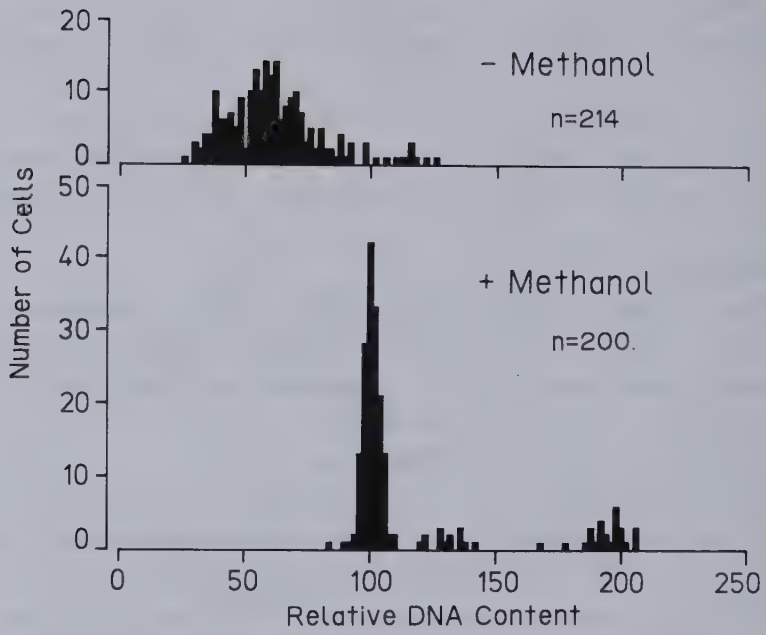


Fig.6-2. Nuclear DNA content of methanol untreated (upper panel) and treated (lower panel) cells of *G. nagasakiense*. Histograms are normalized with the mode of G_1 peak in the methanol treated cells as 100.

Table 6-1. Effect of DAPI concentration on mean fluorescence intensity of cells in G_1 and G_2+M phases of *G. nagasakiense*.

DAPI Conc. ($\mu g\ ml^{-1}$)	n	Mean		CV		Mean ratio
		G_1	G_2+M	G_1	G_2+M	(G_2+M/G_1)
0.005	150	0.24	-	26.85	-	-
0.05	160	2.44	3.92	16.90	8.69	1.60
0.5	163	6.30	11.87	3.63	3.86	1.88
5.0	170	5.34	9.17	8.65	6.49	1.72

5 $\mu g\ ml^{-1}$では蛍光強度は低下し，さらに変動係数も増加した。この濃度で染色した細胞を顕微鏡観察すると，核以外にも細胞質が染色され黄色の蛍光が観察された。そのため核の青色蛍光は不明瞭であった。DAPI 濃度 0.5 $\mu g\ ml^{-1}$における G_1と G_2+M ピークの CV は 3.6～3.9 %と最も小さく，さらに両ピークの蛍光強度の比も1.88と最も大きかった。以上の結果から，*G. nagasakiense* の核染色及び蛍光測光のための最適 DAPI 濃度は0.5 $\mu g\ ml^{-1}$であると判断された。

染色後 4 ℃の暗所に保存した細胞の時間経過に伴う DNA 蛍光の変化を Table 6-2に示した。G_1及び G_2+M 各ピークの蛍光強度，並びにそれらのピークの CV から判断すると，染色後

Table 6-2. Time course of mean fluorescence intensity of cells in G_1 and G_2+M phases of *G. nagasakiense* stained with DAPI at 0.5 $\mu g\ ml^{-1}$ and kept in the dark at 4 ℃.

Time (day)	n	Mean		CV		Mean ratio
		G_1	G_2+M	G_1	G_2+M	(G_2+M/G_1)
0	163	6.30	11.87	3.63	3.86	1.88
1	95	7.23	13.77	3.87	3.09	1.90
5	100	6.87	13.09	3.16	4.62	1.91
8	110	6.96	13.12	4.34	4.47	1.89
13	100	6.91	12.80	4.57	5.54	1.85
39	100	6.12	11.79	3.80	4.12	1.93

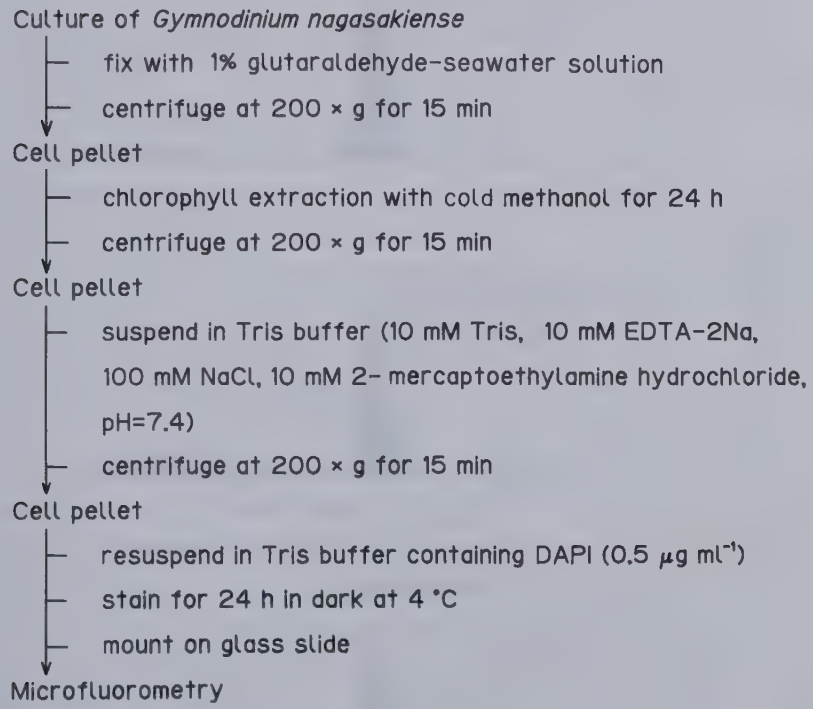


Fig.6-3. Method for the determination of nuclear DNA content using epifluorescence microfluorometry.

24時間以降に測光を行った場合に良好な結果が得られた。さらに，染色後の細胞を冷暗所に保存すれば，最低一ヵ月間にわたり蛍光強度は安定であった（Table 6-2）。

紫外線連続照射による蛍光の退色を調べた結果，HAMADA and FUJITA（1983）の Tris 緩衝液で調製した DAPI を用いた場合，5分以内の連続照射では退色は見られず，さらに10分でも5％程度の退色にとどまった。

以上述べたような検討結果に基づき，顕微蛍光測光による *G. nagasakiense* の核 DNA 量測定の手順は Fig. 6-3のようにまとめられる。

Fig. 6-4に周防灘産の G303株及び五ヶ所湾と浜名湖より得られた天然細胞について得られた DNA ヒストグラムを示す。天然細胞は南西海区水産研究所に到着した後に光点灯中の培養器に入れ，10時間の暗期を経験した後，次の明期開始から約 3 時間後に固定したものである。これは明確な明暗周期を経験させることによって，輸送中（暗所）に乱れたであろう細胞周期を揃え，明瞭な G_1及び G_2+M のピークを得るための処理である。Fig. 6 4から明らかなように，培養細胞（G303）と上記二ヵ所から得られた天然細胞の DNA ヒストグラムにおける G_1及

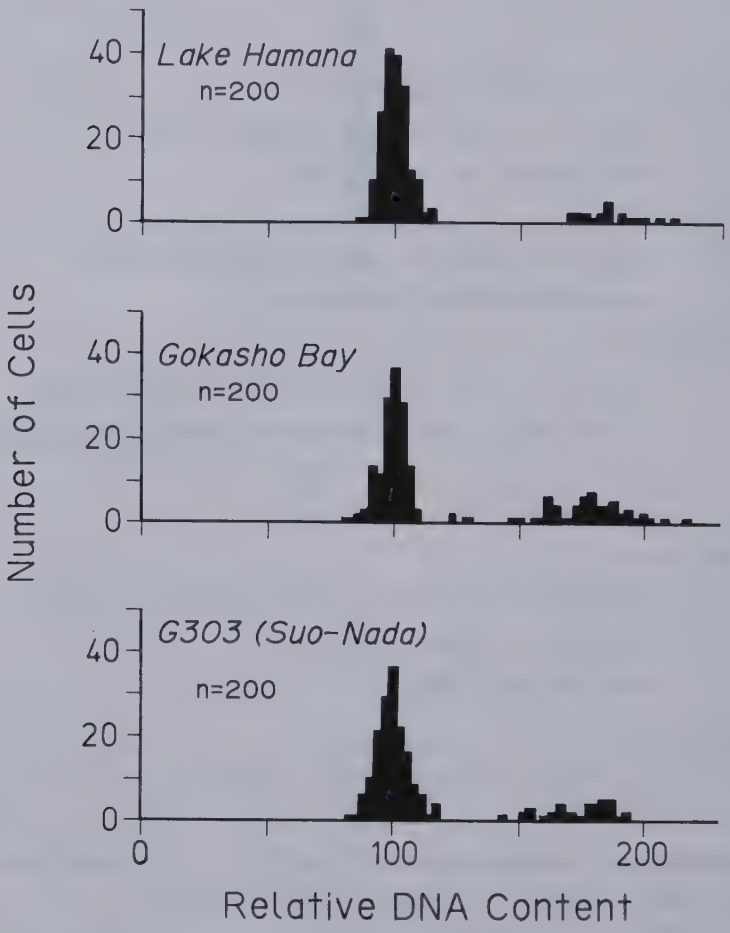


Fig.6-4. Nuclear DNA contents of cultured and natural populations of *G. nagasakiense* obtained from the locations shown in Fig. 6-1. Histograms are normalized with the mode of G_1 peak in strain G303 as 100.

び G_2+M のピークはほぼ同じ横軸上の位置にみられた。さらに，それらの G_1 細胞の蛍光強度の平均値間には統計的に有為な差は見られなかった（F-test df=2, 472, $p>0.05$）。したがって，異なる3海域から得られた *G. nagasakiense* は同じ核 DNA 量を持つことが明らかとなった。さらにこの結果はここで用いた DNA 測定法が充分な再現性を持つこと，そして天然細胞にも適用可能であることを示している。

考　察

YENTSCH *et al.*（1983）は，有毒渦鞭毛藻 *Gonyaulax tamarensis* var. *excavata*（= *Alexandrium tamarense*）の DNA 量を mithramycin 染色を行ってフローサイトメトリーで測定する際に，クロロフィル等の色素タンパクによる蛍光の減衰が起こることを指摘している。本研究においても *G. nagasakiense* の細胞を DAPI で染色した際に発せられる蛍光強度は，メタノール処理によるクロロフィルの除去によって約2倍になり，さらに G_1 及び G_2+M の各ピークが明瞭に分離された（Fig. 6-2）。メタノール無処理区における蛍光強度の低下及びピークの非分離の原因は，DAPI-DNA 複合体の蛍光波長450 nm（KASTEN 1989）とクロロフィル a の吸収波長440 nm とがほぼ一致することから，核から発せられる青色蛍光がクロロフィル a によって再吸収されるためと考えられる。OLSON *et al.*（1983）は DAPI よりも蛍光波長が長い蛍光色素 Hoechst 33342（蛍光波長465 nm，KASTEN 1989）を用いた場合でも同様の現象を指摘している。したがって，DAPI 染色と顕微鏡蛍光測光の組合せによって DNA 量の測定を行う場合には，あらかじめクロロフィルを抽出除去することが不可欠であることが明らかである。*G. nagasakiense* の場合にはメタノール処理法が有効であることが判明した。

近年種々の細胞の核 DNA を定量するためにフローサイトメトリーが用いられている（DEAN 1985）。フローサイトメトリーに比較すると，ここで用いた顕微蛍光測光法は測定に長時間を要する。本研究では，細胞密度にもよるが，200細胞の蛍光強度を測定するのに約20～30分要した。そのため，紫外線の連続照射による蛍光の退色が顕微蛍光測光法におけるもう一つの重要な誤差要因となる可能性がある。事実，HULL *et al.*（1982）は mithramycin による染色の場合には退色が著しく速く，3分の紫外線照射で蛍光値が当初の33～44%に減少すると報告している。しかし，本研究では HAMADA and FUJITA（1983）の Tris 緩衝液を用いた結果，10分の紫外線連続照射でも退色は5%であった。実際の測定の際には，顕微鏡のステージを動かすことによって広い視野にわたり対象細胞を探索する。そのため同一視野に長時間留まることはなく，この程度の退色であれば測定値への影響を考慮する必要はないと考えられる。

CHANG and CARPENTER（1988）は有殻渦鞭毛藻 *Heterocapsa triquetra* の核染色に適当な DAPI 濃度は，0.5～5 $\mu g\ ml^{-1}$ と比較的広範囲であったと述べている。しかし，*G. nagasakiense* の場合，最適濃度は0.5 $\mu g\ ml^{-1}$ であり，5 $\mu g\ ml^{-1}$ では明らかに過染色（細胞質が黄色，核の青色蛍光強度の低下）になることが判った（Table 6-1）。この結果は COLEMAN *et al.*（1981）の観察とも一致しており，明らかに過染色と考えられる。以上のことは種によって DAPI の核への染色性が異なることを示している。このような染色性の差をもたらす要因としては，種の

違い以外にもDAPI溶液を調製するために用いた緩衝液及び塩類濃度の差が考えられる。例えば，濾過海水で調製したDAPIで染色した*G. nagasakiense*は，塩類を含まない蒸留水で調製したDAPIを用いた場合よりも蛍光値が低いことが判明した。このようなNaClによる蛍光値への影響は，他の蛍光プローブであるPropidium Iodide (PI)でも報告されている(野村・星野 1988)。したがって，DAPI溶液を調製する際には適当な緩衝液を用いることが必要である。さらに，天然海水中に粘土粒子等の浮遊物質が多量に含まれる場合にも，DAPIによる染色が悪くなることが認められた。したがって，異なる培養種あるいは天然個体群に本方法を応用する際には，あらかじめ適正なDAPI濃度を検討しておく必要がある。

本研究で得られた*G. nagasakiense*のG_1及びG_2＋Mピークの変動係数（CV）は3.09～5.54%であった（Table 6-2)。OLSON *et al.* (1983) によれば，彼らのフローサイトメーターで蛍光粒子を測定した場合のCVは約3%であるが，植物プランクトン試料では種によってかなり異なり，6～14%であった。一方，CHANG and CARPENTER（1988）は，テレビカメラを用いた顕微蛍光測光によって渦鞭毛藻*H. triquetra*の核DNAを測定した場合のCVは6.22%であったと述べている。したがって，本研究によって得られたCV値はフローサイトメトリーに匹敵するものである。

これまで述べてきたように，顕微蛍光測光法を用いて*G. nagasakiense*の核DNA量が測定可能であることが明らかとなった。本手法の優れる点として，フローサイトメーターのような高額の機器を必要としないこと，測光する細胞の形態を直接確認できることや，低い細胞密度の場合あるいは群体を作る種でも個々の細胞が測定可能であるため天然試料にも適用可能なことが挙げられる。

第2節　培養条件下における細胞周期

渦鞭毛藻の細胞分裂は明暗周期のもとでは特定の時間に同調的に起こることが知られている。したがって，そのDNA合成もある時間帯に集中して起こるように思える。しかしながら，これまでの研究によれば渦鞭毛藻のDNA合成は様々であり，ある種では真核生物と同様のS期が存在するが，別の種では連続的なDNA合成が報告されている（TRIEMER and FRITZ 1984)。第V章で述べたように*G. nagasakiense*についても同調的細胞分裂が室内実験及び現場海域で確認された。しかし，そのDNA合成については不明であり，細胞周期解析による増殖速度推定法（CARPENTER and CHANG 1988，CHANG and CARPENTER 1988）を本種に応用する上でも，その細胞周期を明らかにしておく必要がある。

本節では前節で確立した*G. nagasakiense*のDNA測定法を用いて本種の核DNA分布の日周変化を明らかにするとともに，分裂指数及び細胞体積の経時変化を調べることによって本種の基本的な細胞周期を検討した。その結果に基づき本種の細胞周期の特徴について論じた。

材料及び方法

1. 供試株

実験には周防灘より分離した *G. nagasakiense* の無菌クローン株（G303 AX 2）を用いた。

2. 培養実験

改変 SWM 3培地700 m*l* を入れた 1 liter の三角フラスコに *G. nagasakiense* を接種し，温度25℃，光強度120 μE m^{-2}s^{-1}，明暗周期12hL:12hDの条件下で培養を行った。明期の開始は06:00に，また暗期の開始は18:00に設定した。培養が対数増殖期初期（細胞密度800 cells m*l*$^{-1}$）に達したところで，午前10:00から24時間にわたり 2 時間ごとに培養10 m*l* を採取した。暗期における試料採取は暗所（光強度 5 ×10^{3} μEm^{-2}s^{-1}）で行った。採取した培養試料は等量の 1 %グルタールアルデヒド海水溶液と混合して固定後，前節の方法でクロロフィルを除去した後に細胞核を染色し，顕微蛍光測光法によって核 DNA 量の測定を行った。各試料について200細胞以上の測定を行い，採取時間ごとの DNA ヒストグラムを作成した。また培養採取と同時に Coulter Multisizer（aperture tube＝100 μm）（Coulter 社）による生細胞の粒径組成を測定した。さらに固定試料について第Ⅴ章に示した方法によって細胞分裂指数（FDC）を求めた。

結　果

室内培養条件下における *G. nagasakiense*（G303株）の分裂指数及び細胞密度の経時変化を Fig. 6-5に示した。本種は明瞭な同調的細胞分裂パターンを示した。細胞密度は10:00から00:00まではほぼ一定であったが，その後00:00から06:00にかけて急激に増加し，06:00以降再び一定となった。分裂指数は暗期開始 4 時間後の22:00から増加し始め，02:00～04:00に最大値を示した後，06:00には急激に低下した。分裂指数の最大を示した時刻は細胞数の増加期と一致した。これらの結果から，本種の細胞分裂は00:00から始まり06:00には完了することが判明した。

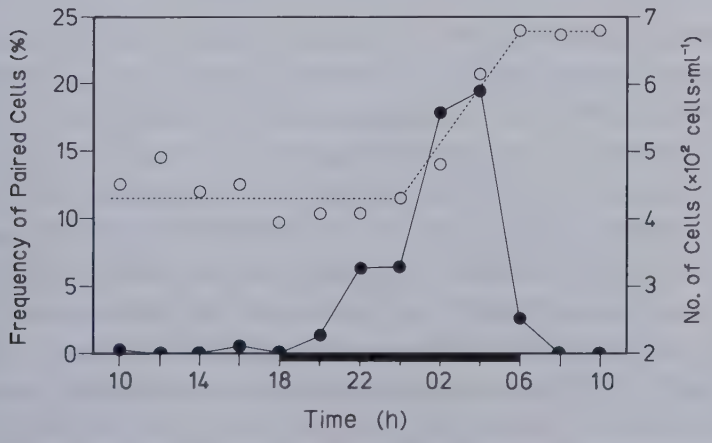


Fig.6-5. Diel changes in cell density (open circle) and frequency of paired cells (closed circle) in an exponentially growing culture of *G. nagasakiense* at 25℃. Dark bar represents the dark period.

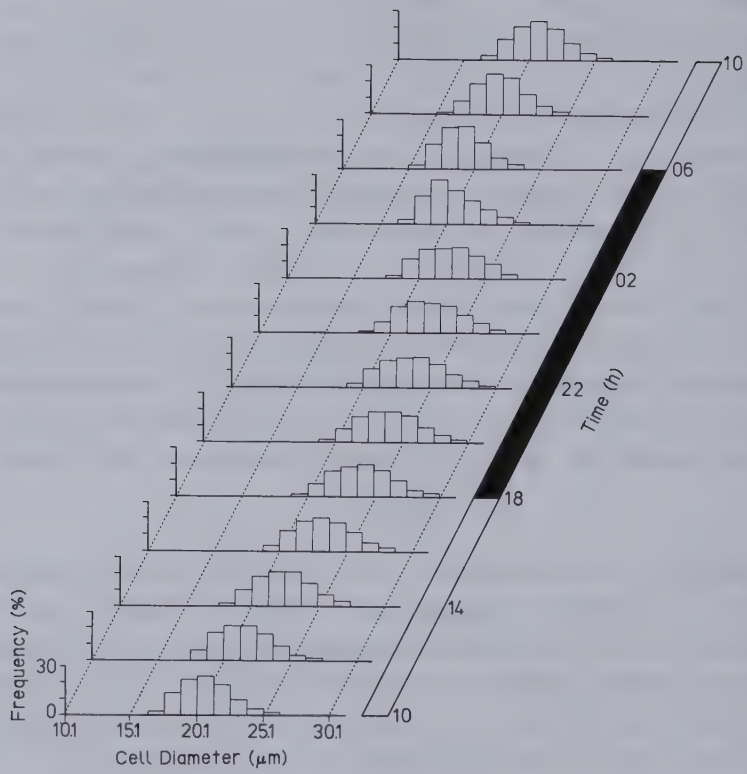


Fig.6-6. Diel changes in cell size frequency distribution in an exponentially growing culture of *G. nagasakiense* at 25℃. Dark bar represents the dark period.

細胞の粒径組成の経時変化をFig. 6-6に示す。細胞径は正弦関数的に変化した。すなわち，10:00から18:00にかけて細胞は大きくなり，それ以降22:00までは変化しなかったが，00:00以降06:00にかけてその減少が見られた。この細胞径の減少の時刻は細胞分裂の時刻と一致した（Fig. 6-5）。その後06:00から10:00にかけて再び細胞径の増大がみられた。

各時刻における核DNAヒストグラムの変化をFig. 6-7に示す。核DNA分布は顕著な日周変化を示した。実験開始時の10:00にはほとんどの細胞は1CのDNAを有していた。それ以降時間の経過につれて，1Cと2Cの中間のDNA量を有する細胞の割合が増加し，22:00にはほとんどの細胞が2CのDNA量を持つに至った。その後00:00から再び1CのDNAを有する細胞が増加し始め，06:00にはほとんどの細胞のDNA量は1Cとなった。以降08:00までは明瞭な変化は見られなかったが，10:00になると再び中間量のDNAを有する細胞が見られ始めた。

考　察

渦鞭毛藻は真核生物と原核生物の両方の特徴を備えた核を有していることが知られている。

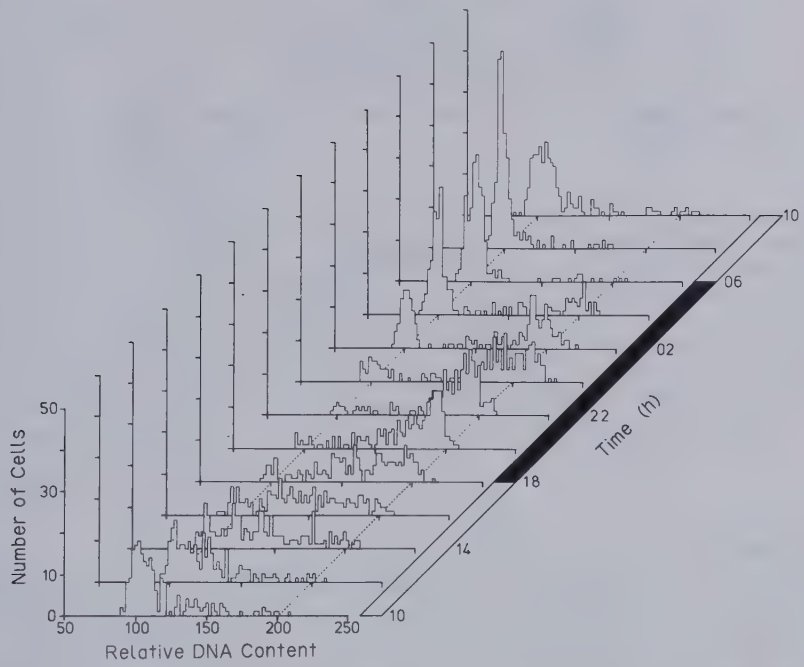


Fig.6-7. Diel changes in nuclear DNA contents in an exponentially growing culture of *G. nagasakiense* at 25 ℃. Histograms are normalized with the mode of G_1 peak at 08:00 as 100. Dark bar represents the dark period.

すなわち，(a)組織化学的に検出可能なヒストンが存在しないこと，(b)クロマチンの径が3～6 nm であること，(c)染色体が核膜に付着すること，(d)有糸分裂の紡錘体が存在しないこと，(e) DNA 合成が連続的であること，(f)クロマチン繊維の超微細構造が細菌の核様体（nucleoid）と同様の渦状を示すこと，(g)染色体が常時凝集していること，等の特徴が挙げられる（Loeblich 1976）。そのため，渦鞭毛藻は原核生物から真核生物への進化の過程で早い時期に分岐したと考えられている（Loeblich 1976）。また，これらを原核生物と真核生物の中間に位置するもの，すなわち“mesokaryote”と考える研究者もいる（Dodge 1965, Hamkalo and Rattner 1977）。ただしこの考え方は論争の的となっている（Rizzo 1987）。このように，渦鞭毛藻は極めて特異な生物群であるため，その DNA 合成に関してそれがいつどのように行われるのか等々，細胞周期に関わる様々な疑問と興味の対象となってきた（Triemer and Fritz 1984）。渦鞭毛藻の DNA 合成に関するこれまでの報告を Table 6-3にまとめた。ここに示されるように，多くの種では真核生物のように明瞭な S 期を有しているが，*Alexandrium tamarense*, *Amphidinium carterae* 及び *Prorocentrum micans* では原核生物のように連続的な DNA 合成が報告されている。本研究において *G. nagasakiense* の核 DNA 量の日周変化を調べた結果，明らかに DNA 量で1Cと2Cの中間量を有する細胞の割合が特定の時間帯のみに高頻度で見られることが判明した（Fig. 6-7）。このことから，*G. nagasakiense* は明瞭に区別され

Table 6-3. Types of DNA synthesis in dinoflagellates.

Species	DNA synthesis		References
	Distinct S	Continuous	
Alexandrium tamarense	+(2 clones)	+(2 colones)	KARENTZ 1983
Amphidinium carterae	+		KARENTZ 1983
		+	GALLERON & DURRAND 1979
Cachonia niei	+		LOEBLICH 1977
Crypthecodinium cohnii	+		FRANKER *et al*. 1974
Gonyaulax polyedra	+		CETTA & ANDERSON 1990
Gymnodinim nagasakiense	+		This study
G. nelsoni	+		KARENTZ 1983
Gyrodinium uncatenum	+		CETTA & ANDERSON 1990
Heterocapsa pygmaea	+		KARENTZ 1983
Peridinium cinctum	+		SPECTOR *et al*. 1981
Prorocentrum micans	+		BHAUD & SOYER-GOBILLARD 1986
		+	DODGE 1966
		+	FILFILAN & SIGEE 1977
P. triestinum	+	+(one clone)	KARENTZ 1983
Scrippsiella trochoidea	+		KARENTZ 1983

るDNA合成期（S期）を有しており，それはほぼ10:00から22:00付近にあると考えられる。これは真核生物における細胞周期の特徴である（LOEBLICH 1976, SPECTOR *et al*. 1981）。以上の結果を踏まえ，細胞分裂指数（Fig. 6-5）及び細胞粒径組成（Fig. 6-6）の日周変化を加えて検討した結果，温度25℃，12hL:12hDの明暗周期のもとで培養した *G. nagasakiense* の細胞周期は，Fig. 6-8に示す模式図のように進行しているものと考えられる。

これまで細胞周期のうち有糸分裂期（M期）が種ごとの増殖速度測定のための指標として用いられてきた（WEILER and CHISHOLM 1976, WEILER and EPPLEY 1979）。MCDUFF and CHISHOLM (1982) は，細胞分裂指数測定のための試料採取間隔に対して，より長時間の分裂指標を用いる方が増殖速度の測定精度向上に有効であることを報告している。上述のように，*G. nagasakiense* におけるS期の細胞は10:00～22:00にかけて見られた（Fig. 6-8）。そこでS期のピークとG_2+M期のピークまでの時間差からDNA合成期の長さを推定すると（HELLER 1977, CETTA and ANDERSON 1990），ほぼ10 hと計算された。この時間は *A. carterae* の6～9 h（GALLERON and DURRAND 1979），*Cachonina niei* の7 h（LOEBLICH 1977），*Gonyaulax polyedra* の1～3 hや *Gyrodinium uncatenum* の2～4 h（CETTA and ANDERSON 1990），*Hetercapsa triquetra* の2.8～4.4 h（CHANG and CARPENTER 1988），*P. micans* の4 h（BHAUD and SOYER-GOBILLARD 1986）のいずれに比べても長い。したがって，S期とG_2+M期の和を分裂指標とすることにより，増殖速度測定の精度向上及び試料採取回数の軽減が期待される（CHANG and CARPENTER 1988）。

KARENTZ (1983) は6種8株の渦鞭毛藻のDNAと細胞密度の経時変化を調べ，DNA合成は必ずしも細胞分裂と同調していないことを示した。しかし本研究の結果から，*G. nagasakiense*

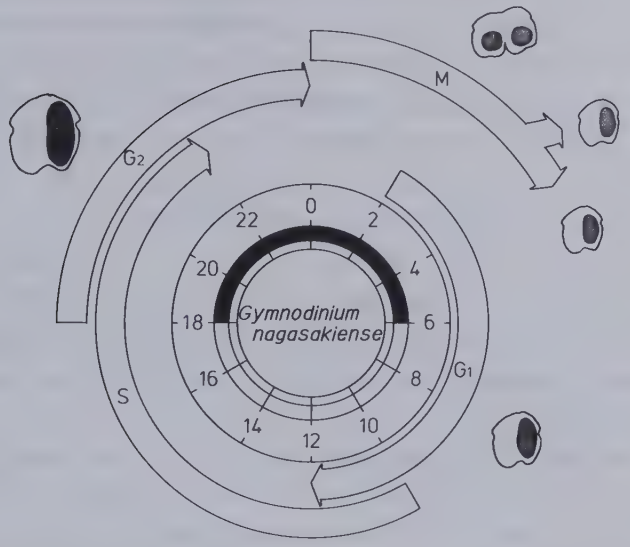


Fig.6-8. Diagrammatic representation of cell cycle events in a 12hL:12hD synchronized culture of *G. nagasakiense* at 25℃. Inner circle shows the time (h). Open bar, light phase; closed bar, dark phase.

のDNA合成は特定の時間帯に位置するS期に起こり，それは細胞分裂（M期）に先行していることが明らかになった（Fig. 6-8）。また前章では *G. nagasakiense* の細胞分裂がやはり同調的に起こっていることが明らかとなっている。これらのことから，本種の細胞周期の各段階は互いに順序よく進行しており，細胞周期の進行になんらかの調節機構が存在するものと考えられる。ところで，*G. uncatenum* ではG_1期は非常に短く，有糸分裂の直後にDNA合成が開始されることが報告されている（CETTA and ANDERSON 1990）。しかし，*G. nagasakiense* では明瞭なG_1期が存在しており，*G. uncatenum* のようなDNA合成パターンは独立栄養型の渦鞭毛藻では例外的なものと考えられる（KARENTZ 1983）。

渦鞭毛藻の生活史には有性的な過程と無性的な過程が見られる場合がある（PFIESTER and ANDERSON 1987）。有性生殖過程では栄養細胞から配偶子が形成され，それらが接合して運動性接合子（planozygote）となる。そして運動性接合子がほとんどの場合休眠接合子（hypnozygote）あるいはシストに至る。有性生殖過程を明らかにするためにはこれらの段階を識別することが必要となるが，外部形態のみでそれを行うことは困難である（福代 1987b）。ただし核相で見ると栄養細胞と配偶子は単相，接合子は複相であるため（PFIESTER and ANDERSON 1987），核DNA量の違いからそれらの識別が可能になる。*G. nagasakiense* の場合には細胞周期の各段階が極めて明瞭に区別され，複相（2C DNA）の細胞の出現はほぼ暗期に限られることから，接合子の検出はもしそれが存在するとすれば比較的容易であると考えられる。

以上述べたように，*G. nagasakiense* は明瞭なS期を有し真核生物に典型的な細胞周期にしたがって増殖していることが明らかとなった。ただし，細胞周期は種々の環境因子によって影響を受けることが考えられることから，今後その方面からの解析が必要となろう。さらに，細胞周期の調節機構を明らかにするためには，細胞周期の各過程で見られる形態的，生化学的変化を調べるのみならず，遺伝子レベルでの研究が今後必要であると考えられる。

第3節　細胞周期に及ぼす温度の影響

細胞周期に関する研究はほ乳類や酵母等について精力的に行われ，多くの知見が得られている（SLATER *et al.* 1977，MITCHISON 1984）。しかし，海産植物プランクトンの細胞周期や，それに及ぼす環境因子の影響は数種について知られているに過ぎない（OLSON and CHISHOLM 1986，OLSON *et al.* 1986，VAULOT *et al.* 1986，NEMOTO *et al.* 1987，VAULOT *et al.* 1987）。したがって，細胞周期を基本とした増殖速度測定法（CARPENTER and CHANG 1988，CHANG and CARPENTER 1988）を *G. nagasakiense* に応用するためには，細胞周期に及ぼすこれら環境因子の影響をあらかじめ評価しておく必要があると考えられる。

温度は植物プランクトンの増殖生理に影響を及ぼす最も基本的な環境因子である。第IV章で述べたように，*G. nagasakiense* は10～30℃までの極めて広い温度範囲で増殖することが明らかとなった。また第V章では温度が細胞分裂時間T_dに影響し，温度が下降するにつれてT_dが増大することが示された。以上のことから，本節では温度が細胞周期に及ぼす影響を検討するため，種々の温度条件下における *G. nagasakiense* の細胞周期を調べた。

材料及び方法

1. 供試株と培地

実験には周防灘より分離した *G. nagasakiense* の無菌クローン株（G303 AX-2）を用いた。培地には改変SWM-3培地（CHEN *et al.* 1969，伊藤・今井 1987）を用いた。

2. DNA組成の日周変化

改変SWM-3培地700 m*l* を分注した1 liter 三角フラスコ4本に10，15，20，30℃で前培養しておいた *G. nagasakiense* をそれぞれ接種し，前培養と同じ温度条件下，光強度120 μE $m^{-2}s^{-1}$，明暗周期は12hL:12hD（明期は06:00～18:00）で培養を行った。培養開始後1～5 Hごとに培養の一部を取り出し細胞数の計数を行って増殖段階を把握した。培養が対数増殖期に達したところで（250～2,000 cells ml^{-1}），24時間にわたり2時間ごとに培養の一部を取り，等量の1％グルタールアルデヒド海水溶液で固定した。固定試料は第1節に示した方法で染色し，顕微蛍光測光法によって核DNA量を測定した。さらに試料採取と同時に生細胞について第2節と同様にCoulter Multisizerによる細胞粒径組成の測定を行った。また固定試料について第V章第1節にしたがって分裂指数を求めた。

各温度で得られたDNAヒストグラムを以下の方法にしたがって細胞周期の各段階（G_1，S，

G_2+M)に分解した。まず，S期の細胞が見られない時間帯のDNAヒストグラムからG_1及びG_2+M期の細胞のモード及びピーク幅を求めた。そしてG_1のモードにそのピーク幅の2分の1を加えた蛍光値以下の細胞をG_1期に属する細胞，またG_2+Mのモードからそのピーク幅の2分の1を差し引いた値より大きい蛍光値のものをG_2+M期の細胞とした。そして，ある時刻におけるヒストグラムの総細胞数からG_1及びG_2+Mに属する細胞数を引いた残りをS期の細胞とした。ただしS期の細胞が終日見られた実験区（15℃以下）では30℃で得られた蛍光値の境界値に基づいてヒストグラムを分解した。このようにして得られたi時刻におけるG_1期，S期及びG_2+M期に属する細胞の割合をP_i (G_1)，P_i (S)，P_i (G_2+M) とする。ここでP_i (G_1) +P_i (S) +P_i (G_2+M) =1である。この値からCARPENTER and CHANG (1988) にしたがってG_1期，S期，及びG_2+M期に要する時間T (G_1)，T (S)，T (G_2+M) を温度ごとに計算した。μを平均増殖速度（divisions day^{-1}），nを24時間中の試料採取回数とすると次式が成り立つ；

$$T\ (S)\ +T\ (G_2+M)\ =\ \frac{1}{n\cdot\mu}\sum_{i=1}^{n}\ln\left[1+P_i\ (S)\ +P_i\ (G_2+M)\right]$$

ここでα，βを以下のように定義すると，

$$\alpha=\left[T\ (S)\ +T\ (G_2+M)\right]/2$$

$$\beta=\frac{\sum_{i-1}^{n}\ln\left[1+P_i\ (S)\ +P_i\ (G_2+M)\right]}{\sum_{i-1}^{n}\ln\left[1+P_i\ (G_2+M)\right]}-1$$

求めるT (S)，T (G_2+M) は次式で与えられる；

$$T\ (S)\ =2\alpha\beta/\ (\beta+1)$$
$$T\ (G_2+M)\ =2\alpha/\ (\beta+1)$$

また，

$$T\ (G_1)\ =GT-\left[T\ (G_2+M)\ +T\ (S)\right]$$

ここでGTは世代時間（day）を示す。

結　果

各温度条件下における核DNA分布の経時変化をFig. 6-9に示す。30℃では前節に示した25℃の場合と同様に明瞭な日周パターンが見られた。すなわち，実験開始時にはほとんどの細胞は1CのDNAを有していたが，時間の経過と共に1Cと2Cの中間量を示す細胞が増加し，22:00にはほぼすべての細胞が2CのDNAとなった。その後再び1CのDNAを有する細胞が増加し始め，06:00にはほぼすべてが1Cとなった。このようなDNA分布の変化は20℃でも同様に見ら

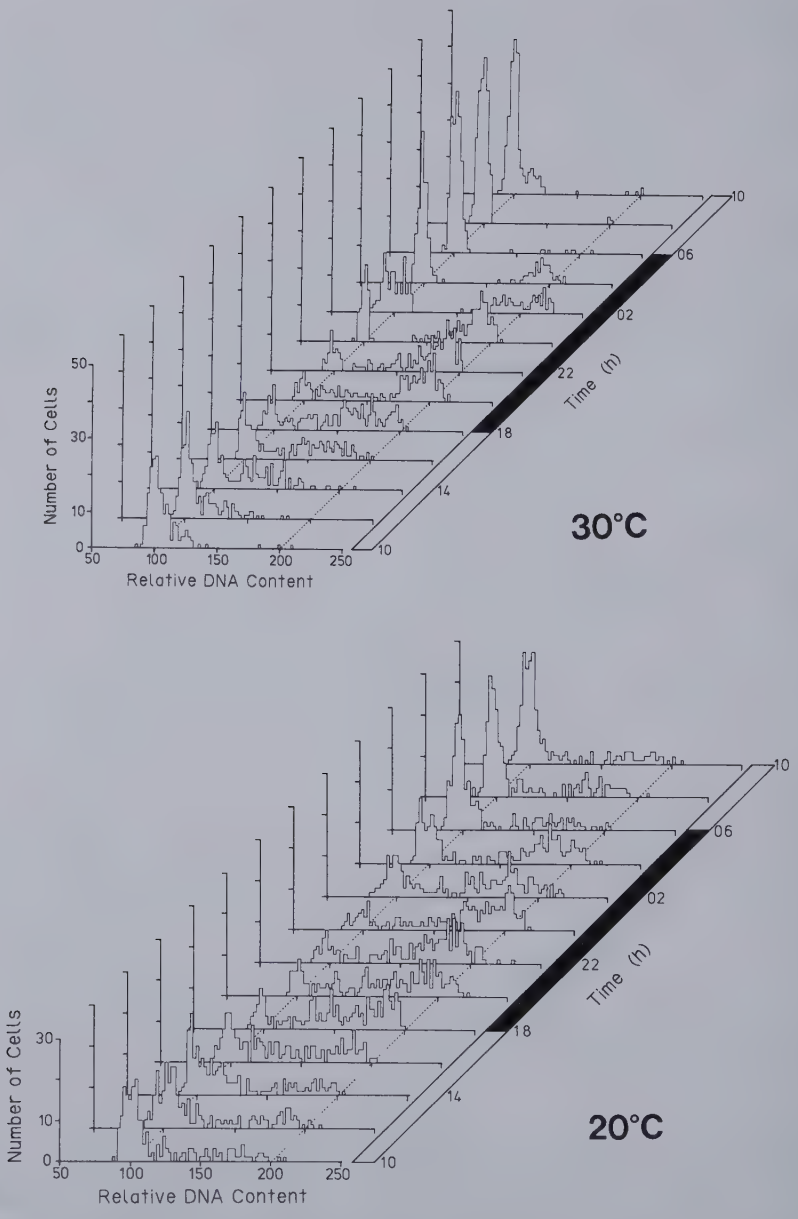


Fig.6-9. Diel changes in nuclear DNA contents in an exponentially growing culture of *G. nagasakiense* at various temperatures. Upper panel: 30℃, Lower panel: 20℃. Histograms are normalized with the mode of G_1 peak at 08:00 as 100. Dark bars represent the dark period.

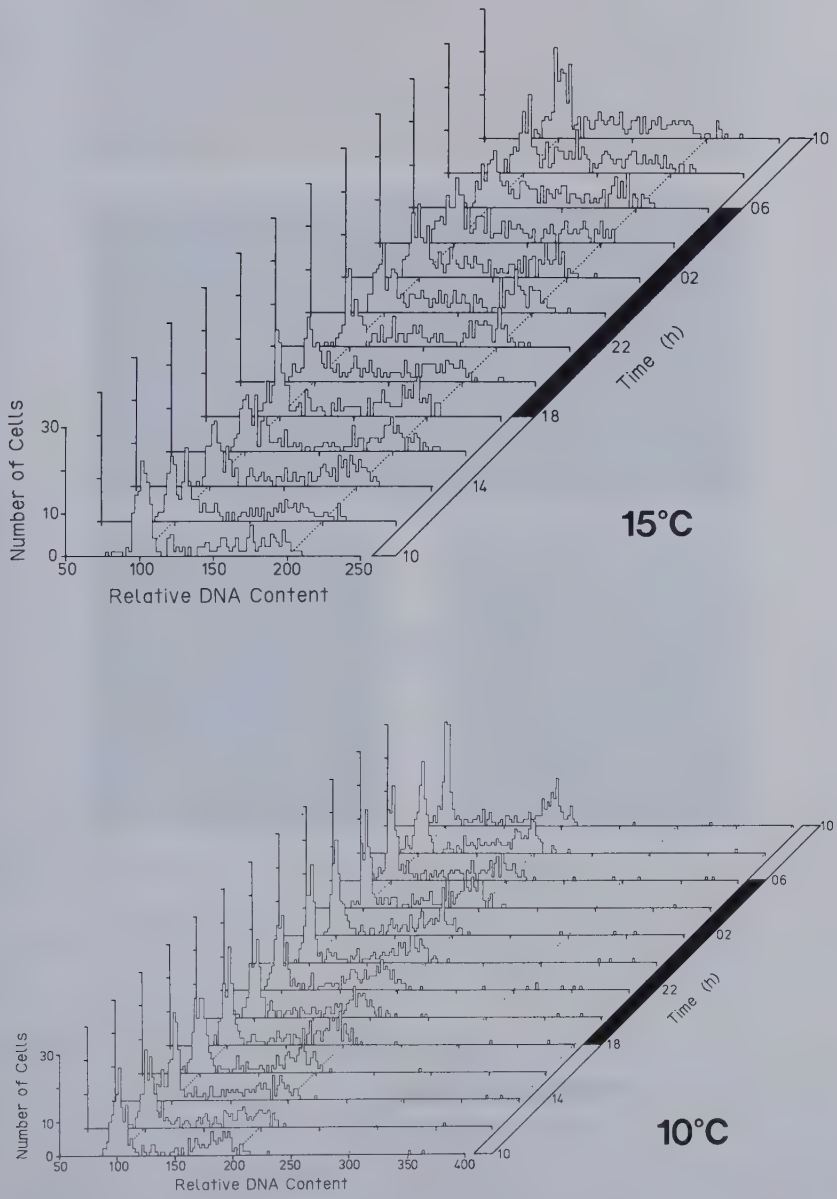


Fig.6-9. (Continued). Upper panel: 15℃, Lower panel: 10℃.

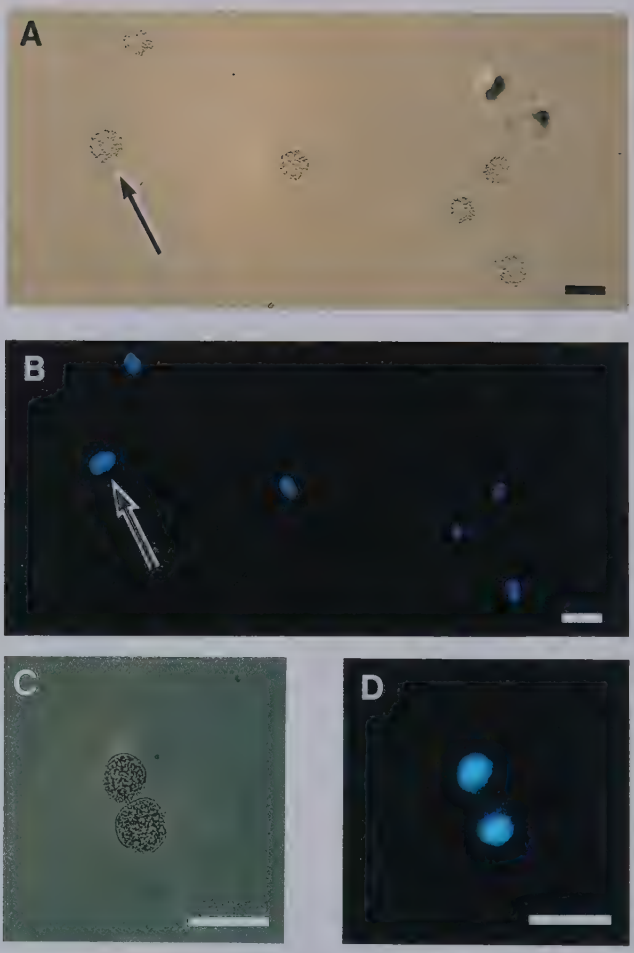


Fig.6-10. Light (A, C) and epifluorescence (B, D) micrographs of *G. nagasakiense* cultured at 10 ℃. Nuclei were stained with DAPI. Scale bars＝50 μm.
A. Vegetative cells. Cell with 4C DNA is indicated with arrowhead.
B. The same cells as in A. Nucleus with 4C DNA is indicated with arrowhead.
C. Dividing cell with 4C DNA.
D. The same as in C.

れた。しかし，15℃になるとDNA分布の変化は不明瞭になり，終日G_1，S及びG_2＋M期の細胞が観察された。さらに10℃になると，DNA分布にはほとんど経時変化が見られなかった。また，2Cを越え3Cあるいは4CのDNAを有する細胞が暗期を中心に少数ながら観察された。これらの中には分裂途中の形態を示し，4CのDNAを有する細胞も観察された（Fig. 6-10）。

各温度における細胞周期の各段階の割合P（G_1），P（S）及びP（G_2＋M）の経時変化をFig. 6-11に示す。*G. nagasakiense* の場合，各段階の境界値は相対蛍光強度で114未満がG_1期の細

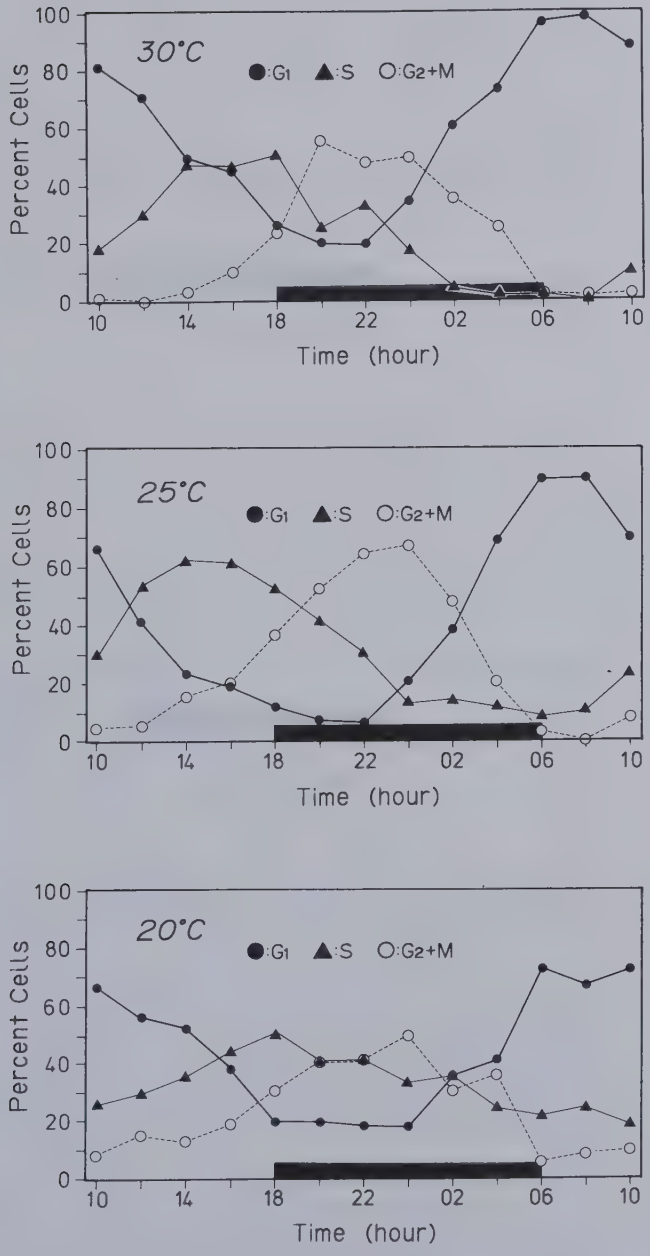


Fig.6-11. Percentages of cell cycle phase (G_1, S, G_2+M) in *G. nagasakiense* grown at various temperatures. Dark bars represent the dark periods.

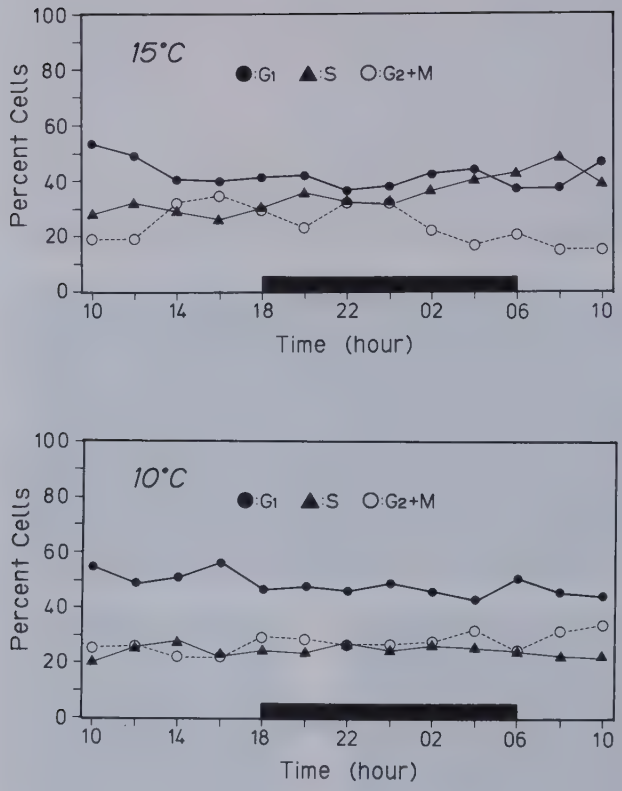


Fig.6-11. (Continued).

胞，114～178までがS期の細胞，178以上がG_2+Mに属する細胞と判断された。なお，Fig. 6-11のうち25℃のデータについては，前節で得られたDNAヒストグラムを分解した結果である。まず30℃の場合であるが，細胞周期の各段階（G_1，S，G_2+M）の割合は互いに一定の位相のずれを保ちながら正弦関数的に変化した。すなわち，10:00には80%の細胞がG_1期に属したが時間の経過とともにその割合が減少し，22:00に最小となった。それ以後再び増加に転じ，08:00にはほとんどすべての細胞がG_1期のもので占められた。この P（G_1）の経時変化から *G. nagasakiense* の細胞周期時間はほぼ24時間であることが推察された。S期の細胞は10:00から増加し始め，18:00付近で最大値を示した後，02:00から08:00にかけては全く出現しなかった。G_2+M 期の細胞はS期のものより 6 時間程度遅れた16:00から増加し始め，20:00～00:00付近で最大値を示した後減少し，06:00には見られなくなった。25℃の結果は30℃とほぼ同様であった。20℃では各段階の経時変化は勾配がなだらかで最大値も低く推移したが，基本的には25℃以上の場合と同様のパターンを示した。ただし，G_1期の細胞が暗期でも20%程度見られた。

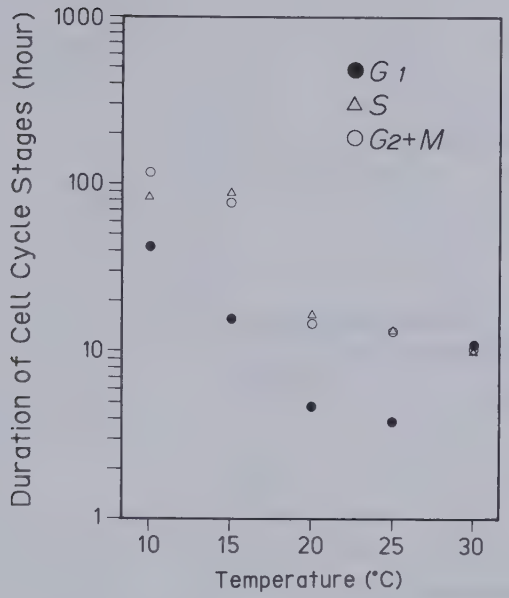


Fig.6-12. Relationship between temperature and duration of the cell cycle phase (G_1, S, G_2+M) in *G. nagasakiense*.

15℃になると各ピークが不明瞭になった。しかし，G_1期の細胞は10:00でその比率が高く22:00で低い，S期の細胞は08:00付近で多く出現し16:00で少ない，さらにG_2+M期の細胞は16:00から00:00にかけて多いが04:00以降減少する，等の変化が認められた。10℃になるとそれぞれの段階の細胞の出現に明瞭な変化は見られなかった。一日を通してG_1期の細胞が約50%を占め，残りの50%をS期とG_2+M期の細胞が同じ割合で存在していた。

温度とG_1期，S期及びG_2+M期に要する時間との関係をFig. 6-12に，また各温度における増殖速度，世代時間及び細胞周期の各段階に要する時間（T（G_1），T（S）及びT（G_2+M））を計算した結果をTable 6-4にまとめた。G_1期に要する時間は本種の増殖最適水温である25℃よ

Table 6-4. Duration of cell cycle phases of *G. nagasakiense* grown at various temperatures.

Temp. (℃)	Growth rate (div.d^{-1})	Generation time (h)	Durations of cell cycle		
			G_1 (h)	S (h)	G_2+M (h)
10	0.10	240.0	40.7	83.7	115.6
15	0.13	181.8	15.6	89.8	76.4
20	0.66	36.3	4.8	16.8	14.7
25	0.78	30.9	3.9	13.6	13.4
30	0.75	31.9	11.0	10.3	10.6

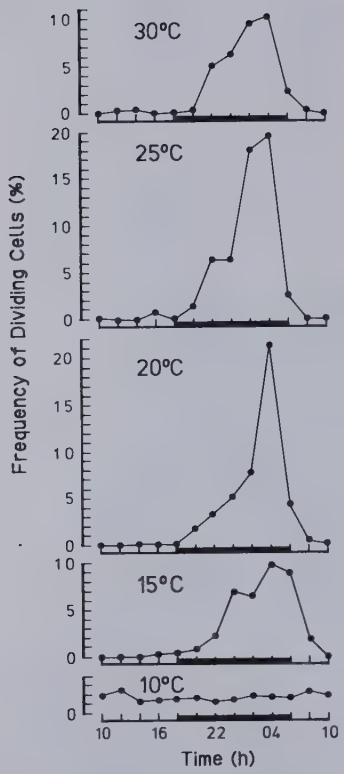


Fig.6-13. Diel changes in frequency of paired cells of *G. nagasakiense* grown at various temperatures.

りも上昇しても，下降しても増加し(Fig. 6 12)，25℃では最小3.9 h，10℃で最大40.7 hであった(Table 6-4)。一方，S期及びG_2＋M期に要する時間は30℃で最小であり，それより温度が下降するにつれて増加した(Fig. 6-12)。G_1期は10.3～89.8 h，G_2＋M期は10.6～115.6 hの範囲にあった（Table 6-4)。

各温度で培養した *G. nagasakiense* の分裂指数の経時変化を Fig. 6-13に示す。細胞分裂は同調的に起こっており，15℃以上の各温度では04:00に分裂細胞の最大出現が見られた。15～30℃における分裂細胞の最大出現頻度はそれぞれ，9.8，21.3，19.5及び10.3%であった。10℃では明瞭な分裂パターンは観察されなかったが，12:00に最大出現頻度2.5%が得られた。

細胞径から計算した細胞体積の経時変化を Fig. 6-14に示す。15℃以上における細胞体積は18:00に最大値を，06:00に最小値を持つ正弦曲線状に変化した。細胞体積は 3×10^3～ 7×10^3 μm^3の範囲にあった。それに対して10℃で培養した場合細胞体積には明瞭な日周変化は見られず，また細胞体積も $8\times10^3\mu m^3$と15℃以上の場合に比べ約2倍に大型化していることが判明した。

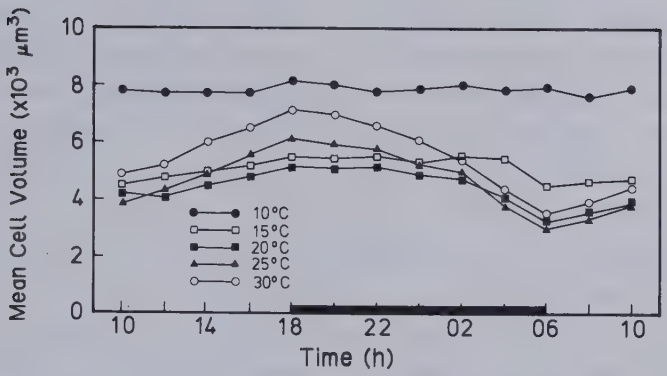


Fig.6-14. Diel changes in cell volume of *G. nagasakiense* grown at various temperatures.

考　察

植物プランクトンの増殖は種々の環境因子によって制御されていることから，増殖の基本となる細胞周期も，それらの因子によって影響を受けることが予想される。海産植物プランクトンの細胞周期に対する環境因子の影響については，数種について報告があるものの（OLSON *et al.* 1986, VAULOT *et al.* 1986, NEMOTO *et al.* 1987, VAULOT *et al.* 1987），渦鞭毛藻に限っては *Amphidinium carterae* に関する報告があるに過ぎない（OLSON and CHISHOLM 1986）。

OLSON *et al.*（1986）は，円石藻 *Hymenomonas carterae* と珪藻 *Thalassiosira weissflogii* の細胞周期に及ぼす温度，光及び窒素の影響を検討し，温度制限下では両種ともG₁期，S期，G₂＋M期のすべての段階で延長が見られるが，窒素制限下ではG₁期のみが延長することを明らかにした。さらに彼らは，光制御下における *H. carterae* ではG₁期のみの延長が見られたのに対して，*T. weissflogii* ではG₁期とG₂＋M期の２つの段階で延長が起こったと述べている。またOLSON and CHISHOLM（1986）は，光あるいは窒素制御下で培養した *A. carterae* の場合，G₁期のみが延長したことを報告している。以上のように細胞周期に及ぼす影響は制限要因となっている環境因子で異なり，さらに種によっても異なるようである。

温度は *G. nagasakiense* の細胞周期の全段階（G₁，S，G₂＋M期）に影響を及ぼし，それらに要する時間を延長させることが判明した（Fig. 6-12, Table 6-4）。この結果は OLSON *et al.*（1986）による *T. weissflogii* 及び *H. carterae* に関する報告と一致するものである。したがって，このような細胞周期に及ぼす温度の影響は植物プランクトンに共通するものと言えそうである。

10℃で培養した *G. nagasakiense* では細胞体積が15℃以上の場合の約2倍に増加し（Fig. 6-14），さらに4CのDNAを有する細胞が観察された（Figs. 6-9と6-10）。このような低温における細胞体積の増加は *Alexandrium tamarense*（WATRAS *et al.* 1982）や *T. weissflogii* 及び *H. carterae*（OLSON *et al.* 1986）でも観察されている。OLSON *et al.*（1986）はこの現象の要

因として，低温が細胞自体の生長よりも分裂速度に影響を及ぼしたためと考えている。これらの種における体積増加は最大40%程度であり，DNA 量の増加は不明かあるいは観察されていない。しかし，*G. nagasakiense* の場合はこれらの場合とは異なり，細胞分裂速度の影響とは考えにくい。また，渦鞭毛藻に通常見られる有性生殖過程では栄養細胞と配偶子は単相（1C DNA）であり，配偶子が接合した運動性接合子や休眠接合子が複相（2C DNA）である（PFIESTER and ANDERSON 1987）。したがって，有性生殖過程のみではここで観察された4C の DNA 量は説明できないであろう。このような4C の DNA 量を説明し得る現象として倍数性（Polyploidy）が考えられる。渦鞭毛藻の倍数性は培養年月が長期にわたると出現することが報告されており（LOPER *et al.* 1980，HOLT and PFIESTER 1982），また渦鞭毛藻の種分化の一つの要因とも考えられている（LOEBLICH *et al.* 1981）。本種の場合，倍数性は低水温で出現していることから，その生活史を明らかにする上でも興味深い知見と言えよう。一般に藻類の倍数性はコルヒチンや紫外線等の人為処理，有性生殖あるいは植え継ぎの繰り返しによって起こるとされている（NICHOLS 1980）。しかし，*G. nagasakiense* については現状のところ倍数性の確証は不十分であり，その成因も含めて今後解明されなければならないであろう。

各温度で得られた増殖速度は最適温度である25℃でも0.78 divisions day^{-1}であり（Table 6-4），本種の最大増殖速度（1.0 division day^{-1}）より小さかった。これは2時間ごとの試料採取時に細胞の均一化を図るため攪拌を行ったことに起因するものと考えられる。一般に渦鞭毛藻は攪拌に弱く（CHANG and CARPENTER 1988，DIXON and SYRETT 1988），特に細胞分裂期の細胞はその影響に敏感である（POLLINGHER and ZEMEL 1981）。したがって，本種の場合も細胞分裂期（M期）で攪拌による細胞数の減少が起こった可能性が考えられる。その結果，細胞数の増加から求めた増殖速度が過小推定となったのであろう。これらのことから，Table 6-4 に示した細胞周期の各時間は，S 期及びG_2＋M期については過大評価，そしてG_1期については過小評価となっている可能性がある。ただしその誤差は最大20%以内にあると考えられる。

上述のように温度は本種の細胞周期の各段階すべてに影響を及ぼし，低温度ではそれらの期間が延長されることが判明した。したがって，先の FDC 法と同様，細胞周期に基づき増殖速度を推定する際にもこのような温度の影響に留意する必要がある。

第4節　現場個体群の細胞周期

これまで培養条件下における *G. nagasakiense* の細胞周期とそれに及ぼす温度の影響を明らかにした。しかし，現場個体群は様々な環境因子の影響下にさらされており，どのような細胞周期で増殖しているかは不明である。そこで本節では現場個体群の細胞周期を明らかにするため，広島湾において現場調査を行い，*G. nagasakiense* 現場個体群の DNA 分布の経時変化を調べた。

材料及び方法

現場調査は前章 Fig. 5-8に示す広島湾の定点で1990年９月17～18日に実施した。17日の10:00より24時間にわたり０m及び２m層よりニスキン採水器によって採水し，その２～３literをガラス繊維濾紙（Whatman GF/C, ϕ150 mm）によって50 ml 程度に濃縮した。濃縮試料は１％グルタールアルデヒド海水溶液と混合して固定後，冷蔵庫中で沈澱法によってさらに10 ml まで濃縮した。濃縮試料について第１節で述べた方法により DAPI 染色を行い，顕微蛍光測光によって DNA 量を測定した。

結果及び考察

現場調査期間の日没は18:15，日の出は05:54であり，したがって明暗周期はほぼ12hL:12hDであった。また水温は表層及び２m層の平均で25.0±0.2℃，天候は曇り時々雨であった。

広島湾における *G. nagasakiense* 現場個体群の核 DNA ヒストグラムの経時変化を Fig. 6-15に示す。表層（０m）及び２m層における DNA 分布は顕著な日周性を示した。すなわち，９月17日の10:00にはほとんどの細胞は１C の DNA を有していたが，時間が経過するにつれて１Cと２Cの中間量の DNA を有する細胞が増加し，22:00にはかなりの細胞の DNA は２Cとなった。それ以降再び１Cの細胞が増加し始め，９月18日の06:00にはほぼ全部の細胞の DNA は１Cとなった。その後10:00になると，再び１Cを越える DNA を有する細胞が見られ始めた。以上の結果から，*G. nagasakiense* の現場個体群は明瞭な DNA 合成期（S期）を有していることが示された。

以上の DNA ヒストグラムから，前節に基づき細胞周期の各段階の割合 P (G_1)，P (S) 及び P (G_2+M) を求めた（Fig. 6-16）。その結果，細胞周期の各段階は互いに一定の位相のずれを保ちながら，ほぼ正弦関数的に変化することが判明した。この結果は前節の室内実験の20～30℃で得られた結果と基本的に一致していた。

広島湾における調査においても4Cの DNA を有する細胞が非常に少ないながら認められた（Fig. 6-17）。これらは通常の細胞に比べて細胞自体及び核が大型であること以外，外部形態上の特徴は見られなかった。現場海域においても倍数体細胞が存在することが確認されたことから，前節で述べた培養条件下における倍数性の出現は人為的な影響によるものではないことが明らかとなった。ただし，現場では25℃において検出されており，培養条件下とは異なっていた。培養条件下における４Cの DNA を有する細胞の出現は暗期に多い傾向が見られ，また２Cと４Cの中間量の DNA を有する細胞や分裂途中の細胞も観察された（Fig. 6-10）。このような４C細胞の成因については２つの可能性が考えられる。第一の可能性は，通常の細胞周期で増殖していた細胞が何らかの原因で倍数化し，２倍体を単相の配偶体とした別の単相世代型の生活環が存在する場合である。第二の可能性は，有性生殖によって接合が起こり２Cの接合子が生じる。この接合子がシストとならずに減数分裂を行ない，その過程で４C細胞（planomeiocyte）が生じる可能性である。このような２倍体を基本とした生活環のサブサイクルや有性生殖過程は本種ではこれまで知られておらず，その検証については将来の課題と言えよう。

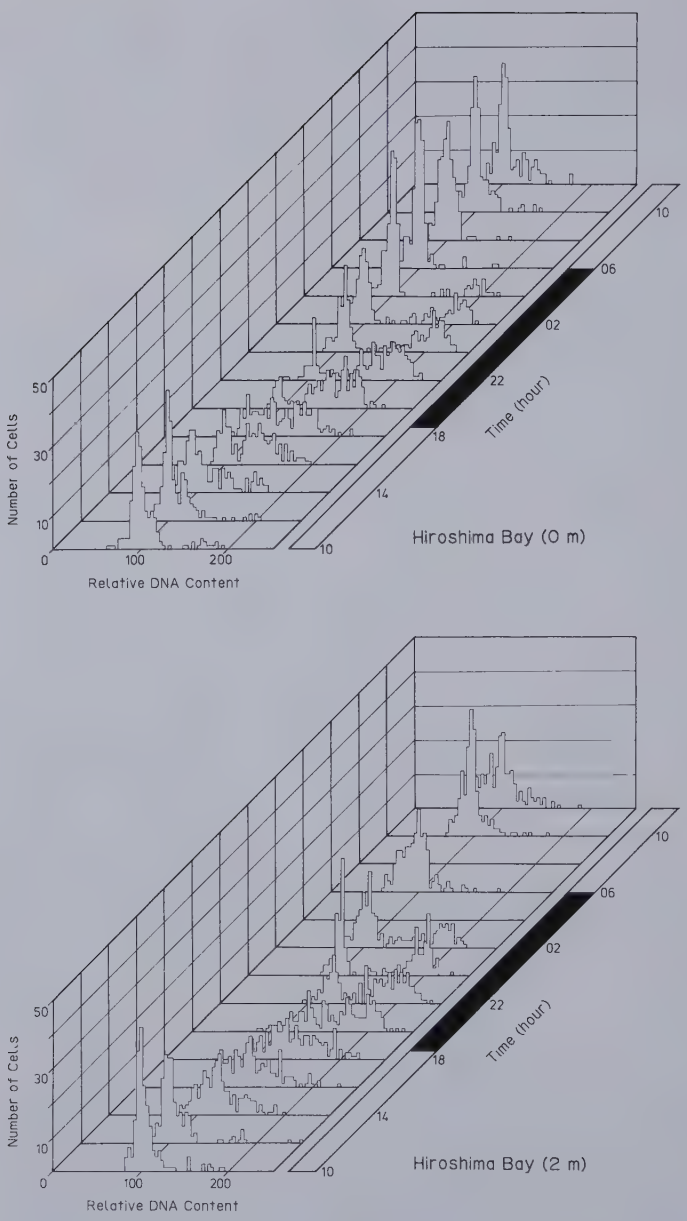


Fig.6-15. Diel changes in nuclear DNA contents in the natural population of *G. nagasakiense* in Hiroshima Bay in September 1990. Histograms are normalized with the mode of G_1 peak at 10:00 as 100. Dark bar represents the night period.

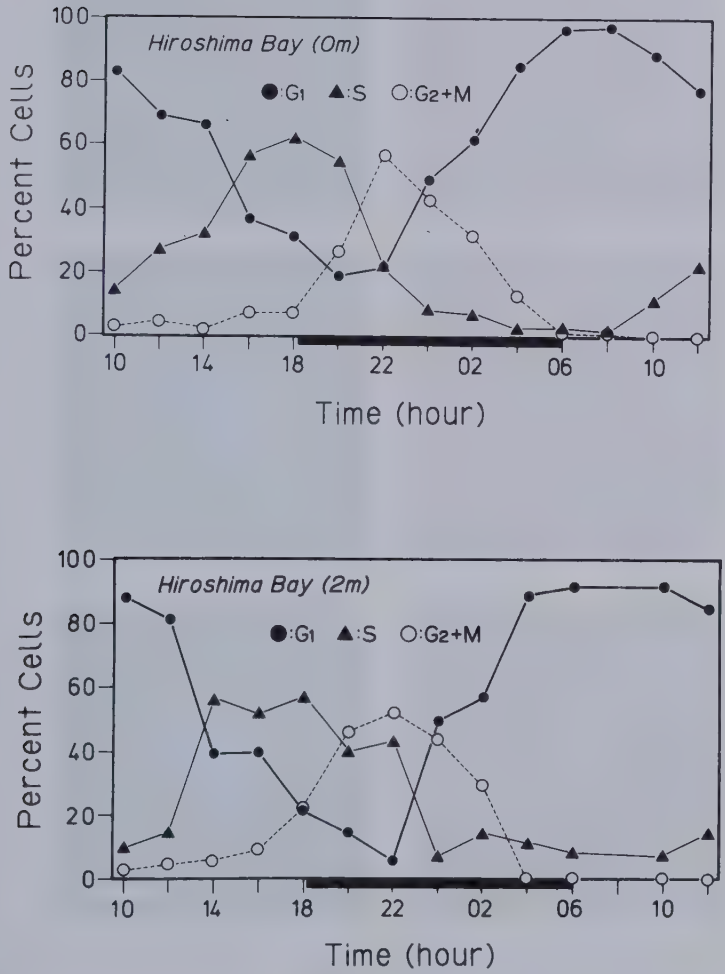


Fig.6-16. Percentages of cell cycle phase (G_1, S, G_2 + M) in natural populations of *G. nagasakiense* in Hiroshima Bay. Dark bars rèpresent the night periods.

以上のように *G. nagasakiense* の現場個体群も培養条件下と基本的に同様の細胞周期で増殖していることが確認された。渦鞭毛藻の現場個体群における細胞周期が明らかにされた例は他に見当たらず，本種が恐らく初めての報告であろう。以上の結果は細胞周期解析による増殖速度測定法が本種にも適用可能であることを示しており，より精度の高い増殖速度を得るためにはこの手法の導入および現場での検証が今後の課題となろう。

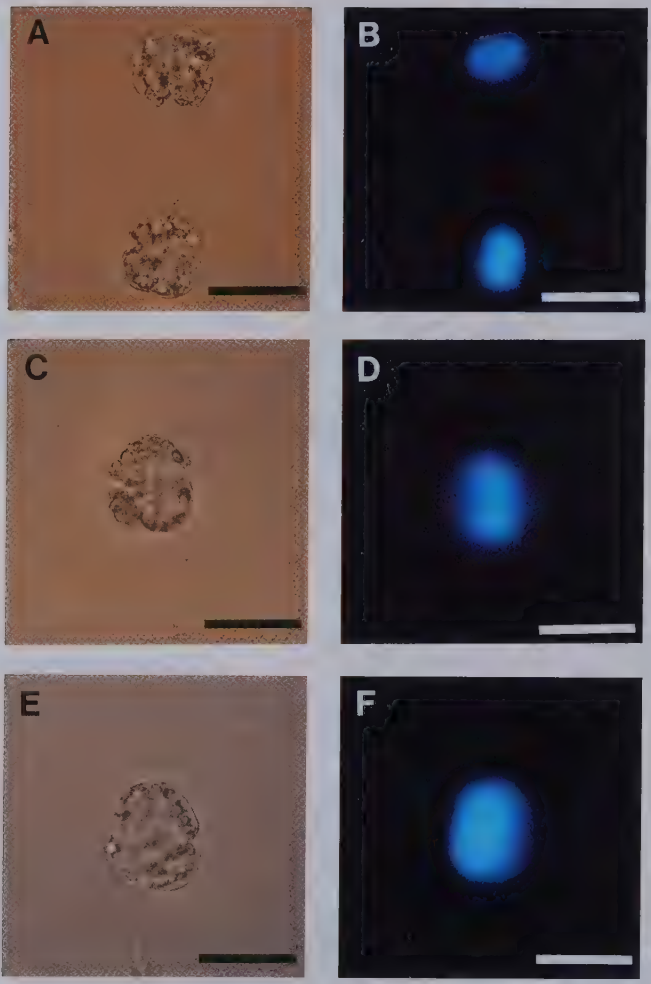


Fig.6-17. Light (A, C, E) and epifluorescence (B, D, F) micrographs of natural cells of *G. nagasakiense* from Hiroshima Bay. Scale bars=30 μm.
A, B: Vegetative cells with 1C DNA.
C, D: Vegetative cell with 2C DNA.
E, F: Vegetative cell with 4C DNA.

第Ⅶ章　総　括

海産渦鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* は，わが国における赤潮原因生物のうち甚大な漁業被害をもたらす有害種として知られている。本種は1965年夏に長崎県大村湾で大規模な赤潮を形成して以来，西日本の沿岸域を中心に赤潮を引き起こし漁業被害を及ぼし続けている。近年では，1984年の熊野灘及び1985年の周防灘における赤潮が顕著で，漁業被害はそれぞれ43億円及び10億円に上る。また九州沿岸域でも深刻な被害が報告されている。このように *G. nagasakiense* は *Chattonella* についで有害な赤潮生物と言える。そのため，本種による赤潮の発生機構及びそれに対する対策が切に望まれてきた。しかし *Chattonella* などに比べて培養が容易でないことなどから，無菌株を用いた系統的な生理・生態学的研究は少なく，解明されていない部分が多く残されていた。

これまで赤潮による漁業被害を防止するため，種々の対策が試みられてきた。しかし，一旦赤潮が発生した後の対策法として実用化されているものは皆無に等しい。その原因としては，赤潮の発生を事前に予知する技術及び赤潮被害を最小限に抑える技術の開発が遅れていることが挙げられる。したがって，より正確な赤潮予知手法の開発が必要であり，そのためにはまず赤潮の発生機構を明らかにすることが前提となる。

以上のような背景から，本研究では *G. nagasakiense* 赤潮の発生機構の解明と赤潮予知のための生物学的情報の強化を図ることを主目的とした。まず，現場調査によって赤潮発生に係わる環境因子の抽出を行うとともに，室内実験によって本種の物理・化学的環境要因に対する増殖生理特性を定量的に明らかにした。また，赤潮予知指標の一つとして増殖速度に着目し，現場におけるその推定法を検討した。さらに本種の細胞周期を明らかにすることによって，増殖速度推定法の基礎を固めるとともに，精度の向上に役立てることを目標とした。本研究によって得られた成果の概要を以下に要約する。

1．1985年から1987年の夏季（6月～8月）に周防灘全域を対象とした現場調査を実施し，*G. nagasakiense* の遊泳細胞の出現と分布及び赤潮発生時における環境要因を調べた。この3年間のうち，1985年は灘全域にわたる大規模赤潮発生年，1986年は一部局所的な小規模赤潮発生年，また1987年は非発生年であった。これら3年間の海況を比較した結果，周防灘における *G. nagasakiense* の大規模赤潮を引き起こす環境要因として，多量の降雨による表層水の著しい低塩分化，密度成層の発達による鉛直安定度の増大及び底層の貧酸素化の程度と規模が重要であることが示された。

2．現場海域における *G. nagasakiense* の季節的消長を把握するため，1989年4月から1990年4月の1年間にわたり，ほぼ1週間毎（秋季から冬季は2週間毎）に高知県浦ノ内湾における栄養細胞の出現密度を調べた。浦ノ内湾における年間の水温は12℃～29℃の範囲で推移した。栄養細胞が検出できなかったのは1989年9月の2回の調査のみであり，したがって同湾で

は *G. nagasakiense* が周年にわたって存在することが示された。高い細胞密度（$>10^2$ cells ml^{-1}）が観察されたのは，夏季（7～8月），冬季（12月中旬～1月）及び春季（4月）の3回であった。また *G. nagasakiense* の出現と珪藻類の出現との間には逆相関が認められた。鉛直分布の中心は2～5mの中層域に見られた。

3．培養実験によって *G. nagasakiense* の増殖速度に及ぼす光強度の影響を調べた。本種は10 $\mu Em^{-2}s^{-1}$の弱光下でも増殖が可能であり，増殖速度は110 $\mu Em^{-2}s^{-1}$で飽和した。また190 $\mu Em^{-2}s^{-1}$まで強光阻害は見られなかった。これらの結果から，本種は弱光下の増殖に有利であり，このような光に対する増殖特性を備えることによって，本種は中層域や低日射量下でもその個体群の増大を可能にしているものと考えられた。

4．*G. nagasakiense* の増殖速度に及ぼす水温と塩分の影響を調べるため，それら2要因（水温：10，15，20，25，30℃，塩分：10，15，20，25，30‰）のすべての組合せ条件下で培養実験を行った。本種は温度10～30℃，塩分15～30‰の範囲で増殖可能であったが，増殖可能塩分範囲は温度によって異なった。最大増殖速度を与える水温と塩分の組合せは25℃，25‰であり，1.06 divisions day^{-1}の増殖速度が得られた。分散分析の結果，水温及び塩分それぞれの主効果とそれらの交互作用が有意であった。したがって，これら2要因が相互に関連しながら増殖速度に影響を及ぼしていることが明らかになった。以上の結果から，本種は広温・広塩分性であると判断された。さらに瀬戸内海の年間最低水温に近い10℃でも十分増殖可能であることから，本種は栄養細胞で越冬し，それが翌年の赤潮のシードポピュレーションとなるものと考えられた。

5．周防灘では *G. nagasakiense* が卓越する年と *Chattonella* が卓越する年があることが現場調査によって明らかになった。そこで，両者の水温，塩分及び光に対する増殖生理を比較するため，*C. antiqua* と *C. marina* についても培養実験を行った。その結果，*Chattonella* は *G. nagasakiense* に比べて増殖に強い光を要求することが判明した。したがって，現場における卓越種の交替に日射量が大きく影響している可能性が示唆された。一方，水温と塩分に対する増殖応答でも，*Chattonella* は10℃では全く増殖できないこと，さらにその増殖速度には水温が非常に大きく影響する点で *G. nagasakiense* とは異なった。このような *Chattonella* と *G. nagasakiense* の温度応答の違いから，両者の生活様式の差異が示唆された。すなわち，*Chattonella* は栄養細胞では越冬できないためシストという越冬手段を必要とするが，*G. nagasakiense* は幅広い温度耐性を有するため栄養細胞で越冬でき，そのためシストのような越冬手段は必要としないと考えられる。本種は周年にわたり栄養細胞で存在することによって，休眠や発芽等の段階を必要とせず，さらに好適条件下では直ちに増殖できるといった生存戦略を有するものと思われる。

6．浦ノ内湾の調査から *G. nagasakiense* と珪藻類との間には何等かの競合関係が存在することが示唆された。そのため4種の珪藻類（*Chaetoceros didymum*，*Ditylum brightwellii*，*Skeletonema costatum*，*Thalassiosira* sp.）について水温と塩分に対する増殖応答を培養実験により調べた。その結果，30℃でも増殖が見られたのは *D. brightwellii* のみであり，しかも増殖

速度は極めて小さかった。したがって，珪藻類は高温かつ低塩分の下では増殖しにくいことが判明した。最大増殖速度を与える水温と塩分の組み合せは4種でほぼ等しく，25℃と30‰であり，増殖速度は2～3 divisions day^{-1}の範囲にあった。ただし25℃では増殖可能な塩分範囲が狭いことから，増殖速度は大きいものの生理的には好適な温度ではないものと考えられる。以上のことから，夏季の現場海域における水温・塩分条件は珪藻類よりも *G. nagasakiense* の増殖に好適であると言える。一方，冬季の水温環境は珪藻類に有利であり，*G. nagasakiense* が優占するためには珪藻類との競合からの解放が必要であると考えられた。

7．*G. nagasakiense* の無菌株を用いて窒素及びリンの利用能を把握した。本種は窒素源として硝酸態，アンモニア態窒素及び尿素のすべてを利用した。硝酸及びアンモニアでは250 μMまで最大収量の低下は見られなかったが，尿素では6.4 μM以上で飽和した。リン源としては無機リン，グリセロリン酸ともに良く利用された。これらの結果から，*G. nagasakiense* は広い濃度範囲にわたって栄養塩を利用でき，さらに有機態の窒素・リンも利用可能であることが判明した。このことは本種が外洋域から内湾域にわたる幅広い栄養環境の下で赤潮を形成し得ることを示している。一方，珪藻類（前述の4種）はすべて尿素を利用できず，さらに *S. costatum* ではグリセロリン酸の利用能が低かった。したがって，有機態窒素・リンの利用能から見ると，*G. nagasakiense* は代表的珪藻類及びラフィド藻（*Heterosigma akashiwo* 及び *C. antiqua*）よりも生態的に優位にあると考えられる。

8．*G. nagasakiense* の細胞内窒素及びリン含量はそれぞれ3.7～4.0 pmol cell^{-1}と0.23～0.35 pmol cell^{-1}で，*C. antiqua* と *H. akashiwo* で報告されている値の中間値であった。この細胞内窒素・リン含量と現場海域における栄養塩濃度から海水の持つ潜在的な細胞増殖密度を計算すると，周防灘では200～4,700 cells ml^{-1}，浦ノ内湾では100～8,300 cells ml^{-1}に達することが判った。このことは，通常の現場海水の栄養塩レベルでも本種は赤潮状態にまで増殖できることを示している。

9．窒素あるいはリン制限下における *G. nagasakiense* の増殖の動力学を培養実験によって検討した。その結果，増殖速度と窒素あるいはリン濃度との関係はMonodの式に従うことが判明した。増殖の半飽和定数（最大増殖速度の1/2を与える栄養塩濃度）は窒素で0.58～0.78 μM，リンで0.14～0.15 μMであった。この値はこれまで渦鞭毛藻で報告されている中で最も小さい値であり，本種は低濃度の栄養条件でも十分増殖できる特性を備えた生物であると言える。

10．現場海域における *G. nagasakiense* の増殖速度を測定するため，細胞分裂指数を用いた推定法を検討した。培養条件下における本種の細胞分裂は，明暗周期の下では暗期の終わり頃に同調的に起こった。この分裂盛期の時刻は光強度や温度によっては影響されないことから，本種の細胞分裂は概日リズム（circadian rhythm）に支配されているものと考えられた。

分裂指数法による増殖速度推定法に必要なパラメータである細胞分裂時間（T_d）は，増殖速度を光強度によって制御した場合には一定であったが，それを温度で制御すると変化した。しかし，温度と分裂時間の間に対数直線関係が得られたことから，その関係式を用いることにより任意の現場水温における分裂時間を推定することが可能であった。培養条件下では，分裂指

数法と細胞数の増加から計算した増殖速度の間には高い相関関係（r＝0.94）が得られた。したがって，分裂指数法により増殖速度を推定し得ることが判明した。

11．現場海域における *G. nagasakiense* の細胞分裂の同調性を調べるため，1987年8月に周防灘，また1989年9月及び1990年9月には広島湾でそれぞれ調査を行った。その結果，いずれの海域においても本種は同調的細胞分裂を行っていることが判明した。分裂指数法によって求めた増殖速度は，周防灘で0.12と0.14 divisions day^{-1}，広島湾では0.27～0.52 divisions day^{-1}であり，本種の最大増殖速度である1.0 division day^{-1}に比べて低かった。両海域とも *G. nagasakiense* の分布密度は低く，赤潮発生には至らなかった。その原因の一つにはこのような低い増殖速度が影響していたものと考えられた。

12．*G. nagasakiense* の細胞周期を明らかにするため，まず顕微蛍光測光とDAPI染色の組合せによる核DNA量の測定法を確立した。この方法を用いて，25℃，12hL:12hDの明暗周期で培養した *G. nagasakiense* の核DNA量，細胞の粒径組成及び分裂指数を経時的に調べた。その結果，DNA量で1Cと2Cの中間量を持つ細胞の割合が特定の時間帯に高くなることが判明した。さらにその前後には明瞭な間期（G_1及びG_2期）が認められた。このことから本種は明瞭なDNA合成期（S期）を有し，他の真核生物と同様の細胞周期に基づいて増殖することが明らかとなった。

13．温度が細胞周期に及ぼす影響を調べるため，10～30℃の5段階の温度条件で培養実験を行った。20℃以上ではG_1期の細胞の割合は正弦関数的に変化した。そのピークの間隔から *G. nagasakiense* はほぼ24時間の細胞周期で増殖していることが判った。しかし温度が低下するにつれて細胞周期の各段階（G_1期，S期，G_2＋M期）に属する細胞の出現ピークが不明瞭になり，10℃では24時間にわたってほぼ一定となった。これらの結果に基づき細胞周期の各段階に要する時間を計算した。その結果，温度は細胞周期のすべての段階に影響を及ぼし，低温になるにつれてそれらに要する時間を増加させることが判った。また10℃では15℃以上の場合に比べ細胞の大きさが増大すること，さらに通常の4倍量のDNAを有する細胞が出現することが確認された。この結果は低温による倍数化が起こっている可能性を示している。

14．1990年9月に広島湾で調査を行い，現場個体群における細胞周期を調べた。その結果，*G. nagasakiense* 個体群は培養条件下と同様の細胞周期によって増殖していることが判明した。したがって，分裂指数法による増殖速度測定の際に，細胞周期の各段階（S期，G_2＋M期）も細胞分裂の指標として利用することが可能となり，測定精度の向上及び調査回数の削減など実用面での改善が期待できた。

15．本種の分類は形態のみに依存していたため分類学的に不確定な部分があり，混乱している現状から，形態分類を補強するための客観的な分類規準として本種の染色体数を調べた。用いた *G. nagasakiense* は周防灘，広島湾，浦ノ内湾及び五ヶ所湾から得られた4株であった。本種の染色体は幅1.5～2 μm，長さ10～20 μmのヒモ状を呈した。4株における染色体計数値には統計的に有為な差は見られず，全計数値に基づく平均±標準偏差は113±5（n＝105）であった。このように安定した計数値が得られたことから，染色体数は本種の分類基準として有効で

あると考えられた。

本研究の結果，物理・化学的要因に対する *G. nagasakiense* の増殖生理が明らかになった。本種は種々の環境要因（光，温度，塩分及び栄養塩）に対して極めて広い増殖可能範囲を有する生物であることが判明した。ところで，赤潮の発生過程には大きく分けて3つの段階があると考えられている（STEIDINGER 1975）。第1の段階は初期個体群の増加，第2段階は適度な環境下での増殖，第3段階は赤潮状態の持続と集積である。そしてそれらの各段階に関与する種々の生物，物理及び化学的要因と赤潮発生過程との関係が種々想定されている（飯塚 1972，岩崎 1973，吉田 1980，西島 1985，木村 1989，今井 1990）。ここではこれらの報告を参照し，さらに本研究によって得られた生物学的諸特性に基づき，*G. nagasakiense* 赤潮の発生に至る諸過程とそこに関与すると考えられる要因を Fig. 7-1に整理した。まず，赤潮のシードポピュレーションとしては越冬した栄養細胞が考えられる。これらの栄養細胞は水温上昇に伴って徐々に細胞密度を増してゆく。そして降雨による塩分低下や栄養塩の補給，日照不足による競合種の脱落，梅雨後の水温及び日射量の増大，鉛直安定度の増加，捕食圧の低下のもとでは最大増殖速度（1.0 division day^{-1}）に近い増殖速度で飛躍的に個体群密度を増大させ，さらには物理的な集積等も加わって赤潮形成に至るのであろう。赤潮衰退後は低温度耐性によって栄養細胞のまま存在し，珪藻類の衰退時にはわずかではあるが細胞密度を増加させながら越冬し，再び初夏の増殖へと向かうものと考えられる。

以上のような *G. nagasakiense* 赤潮の発生過程を考える時，その予知にはどのような方策が考えられるであろうか。まず中・長期的な方法としては，生態モデルを構築しシミュレーションを行うことが挙げられよう。そのためには本研究で得られた本種の増殖速度と種々の環境因子との数量的関係が利用できる。また短期的な予知手法としては，定期的な調査によって細胞密度を把握し，さらにここで確立した細胞分裂指数法によって現場個体群の増殖速度を監視することが考えられる。*G. nagasakiense* 赤潮は依然として西日本各地で猛威を振るっており，それに対する有効な対策が無い現状では，その発生を事前に予知し漁業被害を最小限に食い止めることが最も重要である。本研究で得られた知見も，今後現場での検証を経て，赤潮発生機構の解明及び予知手法の開発のための基礎資料となるものと期待される。

摘　　要

海産渦鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* は1965年以降，西日本各地で赤潮を頻発し，しばしば数十億円に上る漁業被害を及ぼす有害種として知られている。そのため，本種による赤潮の発生機構及びそれに対する対策が切に望まれてきた。しかし，無菌株を用いた系統的な生理生態学的研究は少なく，未解明の部分が数多く残されていた。本論文は *G. nagasakiense* 赤潮の発生機構の解明と赤潮予知のため，現場海域における赤潮発生要因の抽出，種々環境因子に対する増殖特性の解明，現場における増殖速度の測定法の開発及びその基礎の確立等，生物学的情報を取りまとめたもので，その主な内容は次の通りである。

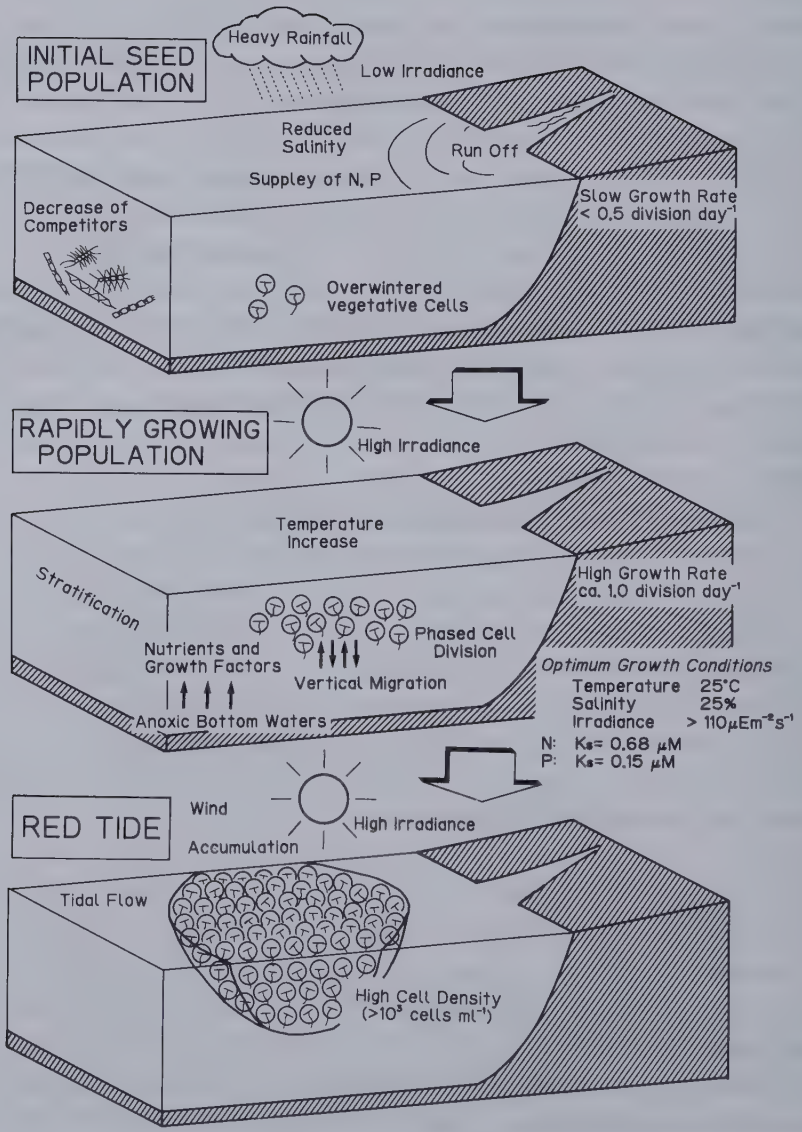


Fig.7-1. A schematic representation of biological phase of *G. nagasakiense* red tide and the factors affecting red tide development.

周防灘全域を対象とした現場調査により *G. nagasakiense* の遊泳細胞の出現と分布及び赤潮発生期における環境要因を調べた。大規模赤潮を引き起こす海況要因として，多量の降雨のよる表層水の著しい低塩分化，密度成層の発達による鉛直安定度の増大及び底層の貧酸素化の程度と規模が重要であることを明らかにした。また，高知県浦ノ内湾における本種の季節的助長を詳細に調査し，本種が周年にわたって栄養細胞で存在することを明らかにした。

培養実験によって *G. nagasakiense* の増殖に及ぼす光強度，水温，塩分及び栄養塩の影響を調べた。本種は10 μEm^{-2}s^{-1}の弱光下でも十分増殖可能であることが判明した。このような光に対する増殖特性を備えることによって，本種は中層域や低日射量下でも他種に優先してその個体群の増大をはかることができると考えられた。

本種は水温10～30℃，塩分15～30 ‰の範囲で増殖可能であり，最大増殖速度は25℃，25 ‰で1.06 divisions day^{-1}であることが判明した。したがって，本種は広温・広塩分性種であること，さらに瀬戸内海の冬季水温に近い10℃でも十分増殖可能であるため栄養細胞で越冬でき，それが翌年の赤潮の初期個体群として重要であると考えられた。

本種は窒素源として硝酸態，アンモニア態窒素及び尿素のすべてを，またリン源としては無機リン，グリセロリン酸を低濃度から高濃度にわたり利用できることが判明した。このような有機態窒素・リンの利用能を他種と比較した結果，*G. nagasakiense* は珪藻類及びラフィド藻よりも生態的に優位であることが判明した。

本種の細胞内窒素及びリン含量はそれぞれ3.7～4.0 pmol cell^{-1}と0.23～0.35 pmol cell^{-1}であった。この細胞内窒素・リン含量と現場海域における栄養塩濃度から海水の持つ潜在的な細胞増殖密度を計算すると100～8,300 cells ml^{-1}に達することが判った。したがって，通常の現場海水の栄養塩レベルでも本種は赤潮状態にまで増殖し得ることが明らかとなった。

本種の増殖速度と栄養塩濃度との関係はMonodの式に従うことが判明した。増殖の半飽和定数（K_s値）は窒素で0.58～0.78 μM，リンで0.14～0.15 μMであった。この値はこれまで渦鞭毛藻で報告されている中で最も小さく，本種は低濃度の栄養条件でも十分増殖できる特性を有することが判明した。

現場海域における *G. nagasakiense* の増殖速度測定法を開発するため，細胞分裂指数による方法を検討した。本種の細胞分裂は夜間に同調的に起こることが判った。分裂に要する時間は光強度によって影響されなかったが，温度によって変化し低温になるにつれ増加した。しかし，温度と分裂時間の間には対数直線関係があり，この関係式に基づき任意の水温における分裂時間が計算できた。分裂指数法と細胞数の増加から計算した増殖速度との間には高い相関関係が得られ，分裂指数法により増殖速度が測定できることが判明した。

顕微鏡蛍光測光とDAPI染色の組合せによる核DNA量の測定法を確立し，それを用いて細胞周期を調べた。その結果，本種は明瞭なDNA合成期（S期）を有し，他の真核生物と同様の細胞周期に基づいて増殖することが判明した。したがって，分裂指数法による増殖速度測定の際に，細胞周期のS期及びG_2＋M期も分裂指標として使用可能なことが明らかとなり，測定精

度の向上及び試料採取回数の削減など実用面での改善が期待できた。

謝　辞

本稿をとりまとめるにあたり，終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜った京都大学農学部教授石田祐三郎先生に深甚なる感謝の意を表しますとともに，本論文について御助言と御校閲の労を賜った 前京都大学熱帯農学専攻 吉田陽一教授に衷心より感謝します。

本研究の機会を与えられ，その遂行に温かい御理解と便宜を与えて下さった前南西海区水産研究所赤潮部長 安楽正照博士（現海外漁業協力財団）に深厚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり，有益な御教示を賜った前三重大学生物資源学部 岩崎英雄教授，並びに広島大学生物生産学部 遠部　卓教授に深く感謝の意を表します。南西海区水産研究所赤潮環境部長 本城凡夫博士，同赤潮生物研究室長 今井一郎博士，養殖研究所環境管理部長 伊藤克彦博士には終始懇切なる御指導と温かい励ましを頂きました。心から御礼申し上げます。また，本校に有益な御意見を頂いた赤潮環境部海況動態研究室長 内田卓志博士に御礼申し上げます。

現場調査にあたり，有益な情報と御助言並びに試料採取にご協力頂いた前福岡県豊前水産試験場の寺田和夫氏，福岡県豊前水産試験場 神薗真人氏（現福岡県海洋技術センター豊前海研究所），高知県水産試験場の村田　宏氏（現高知県室戸漁業指導所），森山貴光氏（現高知県内水面漁業センター），三重県南勢町種苗生産施設 川村龍彦，中村　治の両氏，静岡県水産試験場浜名湖分場 長谷川　仁氏（現静岡県水産試験場），花井孝之氏（現静岡県水産課）に厚く御礼申し上げます。

さらに，現場調査にあたって船上作業に御協力頂いた南西海区水産研究所調査船「しらふじ丸」の乗組員各位に厚く御礼申し上げます。

本研究に対し，多くの御協力と有益な御意見を頂いた南西海区水産研究所赤潮環境部 板倉　茂技官，資源増殖部 有馬郷司室長，東京水産大学 東海　正博士，東北区水産研究所海洋環境部 松尾　豊博士に深謝します。また，研究の遂行に献身的な御協力を頂いた伊藤賀代子氏に記して感謝します。

文　献

安部哲文・平山和次, 1979: *Gymnodinium* sp. のシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* に対する致死作用. 長崎大学水産学部研報, **46**, 1-6.

安達六郎, 1972: 赤潮生物の分類学的研究. 三重県立大学水産学部紀要, **9**, 9-145.

ANDERSON, D.M., 1980: Effects of temperature conditioning on development and germination of *Gonyaulax tamarensis* (Dinophyceae) hypnozygotes. *J. Phycol.*, **16**, 166-172.

ANDERSON, D.M. and F.M.M. MOREL, 1979: The seeding of two red tide blooms by the germination of benthic *Gonyaulax tamarensis* hypnocysts. *Estuar. coast. Shelf Sci.*, **8**, 279-293.

ANDERSON, D.M. and K.D. STOLZENBACH, 1985: Selective retention of two dinoflagellates in a well-

mixed estuarine embayment: the importance of diel vertical migration and surface avoidance. *Mar. Biol.*, **25**, 39-50.

安楽正照, 1985a: プランクトン研究ノート(34) 環境調査とプランクトン(26) 赤潮の発生予知－1. 海洋と生物, **38**, 183-188.

安楽正照, 1985b: プランクトン研究ノート(35) 環境調査とプランクトン(27) 赤潮の発生予知－2. 海洋と生物, **38**, 302-307.

有賀祐勝・横浜康継, 1979: 環境要因の測定.「藻類研究法」(西澤一俊・千原光雄編), 共立出版, 東京, 436-453.

BHAUD, Y. and M.O. SOYER-GOBILLARD, 1986: DNA synthesis and cell cycle of a primitive dinoflagellate, *Prorocentrum micans* Ehr. *Protistologica* **22**, 23-30.

BRAARUD, T. and B.R. HEIMDAL, 1970: Brown water on the Norwegian coast in autumn 1966. *Nytt Mag. Bot.*, **17**, 91-97.

BRAND, L.E., R.R.L. GUILLARD and L.S. MURPHY, 1981: A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. *J. Plankt. Res.*, **3**, 193-201.

BUCHANAN, R.J., 1968: Studies at Oyster Bay in Jamaica, West Indies. IV. Observations on the morphology and asexual cycle of *Pyrodinium bahamense* Plate. *J. Phycol.*, **4**, 272-277.

CAMPBELL, L. and E.J. CARPENTER, 1986: Diel patterns of cell division in marine *Synechococcus* spp. (Cyanobacteria): use of the frequency of dividing cells technique to measure growth rate. *Mar. Ecol. -Prog. Ser.*, **32**, 139-148.

CARPENTER, E.J. and J. CHANG, 1988: Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. I. Concept of the method. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **43**, 105-111.

CARPENTER, E.J. and R.R.L. GUILLARD, 1971: Intraspecific differences in nitrate half-saturation constants for three species of marine phytoplankton. *Ecology*, **52**, 183-185.

CETTA, C.M. and D.M. ANDERSON, 1990: Cell cycle studies of the dinoflagellates *Gonyaulax polyedra* Stein and *Gyrodinium uncatenum* Hulburt during asexual and sexual reproduction. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **135**: 69-84.

CHANG, J. and E.J. CARPENTER, 1985: Blooms of the dinoflagellate *Gyrodinium aureolum* in a Long Island estuary: Box model analysis of bloom maintenance. *Mar. Biol.*, **89**, 83-93.

CHANG, J. and E.J. CARPENTER, 1988: Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. II. DNA quantification and model verification in the dinoflagellate *Heterocapsa triquetra*. *Mar. Ecol. -Prog. Ser.*, **44**, 287-296.

CHEN, L.C.M., T. EDELSTEIN and J. MCLACHLAN, 1969: *Bonnemaisonia hamifera* Hariot in nature and in culture. *J. Phycol.*, **5**, 211-220.

CHISHOLM, S.W., 1981: Temporal patterns of cell division in unicellular algae. In "Physiological bases of phytoplankton ecology" (ed. by T. PLATT), *Can. Bull. Fish. aquat. Sci.*, **210**, 150-181.

CHISHOLM, S.W. and L.E. BRAND, 1981: Persistence of cell division phasing in marine phytoplankton in continuous light after entrainment to light:dark cycles. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **51**, 107-118.

CHO, C.-H., 1981: On the *Gymnodinium* red tide in Jinhae Bay. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **14**, 227-232.

COLEMAN, A.W., M.J. MAGUITRE and J.R. COLEMAN, 1981: Mithramycin- and 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-DNA staining for fluorescence microspectrophotometric measurement of DNA in nuclei, plastids, and virus particles. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 959-968.

DAHL, E and U.H. BROCKMANN, 1985: The growth of *Gyrodinium aureolum* Hulburt in in situ experimental bags. In "Toxic Dinoflagellates" (ed. by D.M. ANDERSON, A.W. WHITE and D. G. BADEN), Elsevier, New York, 233-238.

DALE, B., 1983: Dinoflagellate resting cysts: "benthic plankton". In "Survival strategies of the algae" (ed. by G.A. FRYXELL), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 69-136.

団 勝磨, 1981: 細胞周期の概念とその研究法.「細胞周期」(日本動物学会編) 現代動物学の課題 6, 学会出版センター, 東京, 1-16.

DEAN, P.N., 1985 : Methods of data analysis in flow cytometry. In "Flow cytometry: Instrumentation and data analysis" (ed. by M.A. VAN DILLA, P.N. DEAN, O.D. LAERUM and M. R. MELAMED), Academic Press, London, 195-221.

DEANE, E.M. and R.W. O'BRIEN, 1981 : Uptake of phosphate by symbiotic and free-living dinoflagellates. *Arch. Microbiol.*, **128,** 307-310.

DIXON, G.K. and P.M. HOLLIGAN, 1989: Studies on the growth and nitrogen assimilation of the bloom dinoflagellate *Gyrodinium aureolum* Hulburt. *J. Plankt. Res.*, **11,** 105-118

DIXON, G.K. and P.J. SYRETT, 1988: The growth of dinoflagellates in laboratory cultures. *New Phytol.*, **109,** 297-302.

DODGE, J.D., 1963a: Chromosome numbers in some marine dinoflagellates. *Botanica mar.*, **5,** 121-127.

DODGE, J.D., 1963b: The nucleus and nuclear division in the Dinophyceae. *Arch. Protistenk.*, **106,** 442-452.

DODGE, J.D., 1965: Chromosome structure in the dinoflagellate and the problem of mesokaryotic cell. *Int. Congr. Ser. Excerpta Med.*, **91,** 264-265.

DODGE, J.D., 1966 : The Dinophyceae. In "The chromosomes of the algae" (ed. by M.B.E. GODWARD), St. Martin's Press, New York, 99-114.

DOUGLAS, D.J., 1984 : Microautoradiography-based enumeration of photosynthetic picoplankton with estimates of carbon-specific growth rates. *Mar. Ecol. -Prog. Ser.*, **14,** 223-228.

DUGDALE, R.C., 1967 : Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification, and significance. *Limnol. Oceanogr.*, **12,** 685-695.

DURBIN, E.G., R.W. KRAWIEC and T.J. SMAYDA, 1975: Seasonal studies on the relative importance of different size fractions of phytoplankton in Narragansett Bay (USA). *Mar. Biol.*, **32,** 271-287.

ELBRÄCHTER, M., 1973: Population dynamics of *Ceratium* in coastal waters of the Kiel Bay. *Oikos Suppl.*, **15,** 43-48.

ELSER, M.M. and W.O. SMITH, 1985 : Phased cell division and growth rate of a planktonic dinoflagellate, *Ceratium hirundinella,* in relation to environmental variables. *Arch. Hydrobiol.*, **104,** 477-491.

EPPLEY, R.W., 1972: Temperature and phytoplankton growth in the sea. *Fishery Bull. natn. mar. Fish. Serv., U.S.*, **70,** 1063-1085.

EPPLEY, R.W., 1977: The growth and culture of diatoms. In "The biology of diatoms" (ed. by D. WERNER), Blackwell, Oxford, 24-64.

EPPLEY, R.W., 1980: Estimating phytoplankton growth rates in the central oligotrophic oceans. In "Primary productivity in the sea" (ed. by P.G. FALKOWSKI), Plenum Press, New York, 231-242.

EPPLEY, R.W. and J.L. COATSWORTH, 1968: Uptake of nitrate and nitrite by *Ditylum brightwellii*—kinetics and mechanisms. *J. Phycol.*, **4,** 151-156.

EPPLEY, R.W. and E.H. RENGER, 1974: Nitrogen assimilation of an oceanic diatom in nitrogen-limited continuous culture. *J. Phycol.*, **10,** 15-23.

EPPLEY, R.W., J.N. ROGERS and J.J. MCCARTHY, 1969: Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **14,** 912-920.

FALKOWSKI, P.G. and T.G. OWENS, 1982: A technique for estimating phytoplankton division rates by using a DNA-binding fluorescent dye. *Limnol. Oceanogr.*, **27,** 776-782.

FILFILAN, S.A. and D.C. SIGEE, 1977 : Continuous DNA replication in the nucleus of the dinoflagellate *Prorocentrum micans* (Ehrenberg). *J. Cell Sci.*, **27,** 81-90.

FOY, R.H., C.E. GIBSON and R.V. SMITH, 1976: The influence of daylength, light intensity and temperature on the growth rates of planktonic blue-green algae. *Br. phycol. J.*, **11,** 151-163.

FRANKER, C.K., L.M. SAKHRANI, C.D. PRICHARD and C.A. LAMDEN, 1974 : DNA synthesis in *Cryptothecodinium cohnii. J. Phycol.*, **10,** 91 94.

福岡県豊前水産試験場，1987～1989：海洋・気象観測資料．No.26～28．
福代康夫，1987a：渦鞭毛藻．「赤潮生物研究指針」（日本水産資源保護協会編），秀和，東京，304-476．
福代康夫，1987b：生活史．「赤潮の科学」（岡市友利編），恒星社厚生閣，東京，53-61．
GALLAGHER, J.C., 1980：Population genetics of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) in Narragansett Bay. *J. Phycol.*, **16,** 464-474.
GALLERON, C. and A.M. DURRAND, 1979：Cell cycle and DNA synthesis in a marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Protoplasma,* **100,** 155-165.
GATES, J. and W. WILSON, 1960：The toxicity of *Gonyaulax monilata* Howell to *Mugil cephalus*. *Limnol. Oceanogr.,* **5,** 171-174.
GOLDMAN, J.C. and J.H. RYTHER, 1976：Temperature-influenced species competition in mass cultures of marine phytoplankton. *Biotechnol. Bioeng.,* **18,** 1125-1144.
GUILLARD, R.R.L., 1979：Division rates. In "Handbook of phycological methods. Culture method & growth measurements" (ed. by J.R. STEIN), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 289-311.
GUILLARD, R.R.L. and P. KILHAM, 1977：The ecology of marine planktonic diatoms. In "The biology of diatoms" (ed. by D. WERNER), Blackwell, Oxford, 372-469.
HAGSTRÖM, A., U. LARSSON, P. HÖRSTEDT and S. NORMARK, 1979：Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. environ. Microbiol.,* **37,** 805-812.
HAMADA, S. and S. FUJITA, 1983：DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. *Histochemistry,* **79,** 219-226.
HAMKALO, B.A. and J.B. RATTNER, 1977：The structure of a mesokaryote chromosome. *Chromosoma,* **60,** 39-47.
HARGRAVES, P.E. and F.W. FRENCH, 1975：Observations on the survival of diatom resting spores. *Nova Hedw. Beiheft.,* **53,** 229-239.
HARGRAVES, P.E. and F.W. FRENCH, 1983：Diatom resting spores: significance and strategies. In "Survival strategies of the algae" (ed. by G.A. FRYXELL), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 49-68.
HARRIS, G.P., 1986：Phytoplankton ecology: structure, function and fluctuation. Chapman and Hall Ltd, London, 1-384.
HARRISON, P.J., R.E. WATERS and F.J.R. TAYLOR, 1980：A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.,* **16,** 28-35.
HELLER, M.D., 1977：The phased division of the freshwater dinoflagellate *Ceratium hirundinella* and its use as a method of assessing growth in natural populations. *Freshwat. Biol.,* **7,** 527-533.
HIRAYAMA, K., T. DOMA, N. HAMAMURA and T. MURAMATU, 1989：Role of alkaline phosphatase activity in the growth of red tide organisms. In "Red Tides: Biology, environmental science, and toxicology" (ed. by T. OKAICHI, D.M. ANDERSON and T. NEMOTO), Elsevier, New York, 317-320.
平山和次・飯塚昭二・米司 隆，1972：1971年夏季の大村湾海水による赤潮プランクトン *Gymnodinium* '65年型種の培養．長崎大学水産学部研報，**33,** 11-20.
平山和次・川端豊喜，1982：大村湾南部水域海水による赤潮プランクトン *Gymnodinium* sp.（'65年型種）の培養－Ⅰ．1977，1978，1979年夏期の海況と生物学的分析結果．長崎大学水産学部研報，**52,** 29-40.
HIRAYAMA, K. and K. NUMAGUCHI, 1972：Growth of *Gymnodinium* Type-'65, causative organism of red tide in Omura Bay, in medium supplied with bottom mud extract. *Bull. Plankt. Soc. Japan,* **19,** 13-21.
広川豊康，1977：単細胞藻類の生長・分裂および代謝における日周性．遺伝，**31,** 15-20.
広島地方気象台，1989：広島県気象月報．平成元年9月．1-26.
広島地方気象台，1990：広島県気象月報．平成2年9月．1-24.
HITCHCOCK, G.L. and T.J. SMAYDA, 1977：The importance of light in the initiation of the 1972-1973

winter-spring diatom bloom in Narragansett Bay. *Limnol. Oceanogr.*, **22**, 126-131.

HOLT, J.R. and L.A. PFIESTER, 1982: A technique for counting chromosomes of armored dinoflagellates, and chromosome numbers of six freshwater dinoflagellate species. *Am. J. Bot.*, **69**, 1165-1168.

本城凡夫, 1979: *Gymnodinium* 属の増殖と底泥溶出物質との関係に係わる研究.「*Gymnodinium* 属赤潮の挙動と増殖機構の解明に関する研究報告書（昭和53年度）」（水産庁・環境庁）, 67-78.

本城凡夫, 1987: ギムノディニウム.「赤潮の科学」（岡市友利編）, 恒星社厚生閣, 東京, 228-237.

HONJO, T. 1987: Growth potential of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) collected in Gokasho Bay, central Japan. *Bull. Plankt. Soc. Japan*, **34**, 119-124.

HONJO, T., S. YAMAMOTO, O. NAKAMURA, and M. YAMAGUCHI, 1990: Annual cycle of motile cells of *Gymnodinium nagasakiense* and ecological features during the period of red tide development. In "Toxic Marine Phytoplankton" (ed. by E. GRANÉLI, B. SUNDSTRÖM, L. EDLER, and D.M. ANDERSON), Elsevier, New York, 165-170.

保坂三継, 1990: 東京湾における *Gymnodinium nagasakiense* Takayama et Adachi の出現. 日本プランクトン学会報, **37**, 69 75.

HULBURT, E.M., 1957: The taxonomy of unarmored Dinophyceae of shallow embayments on Cape Cod, Massachusetts. *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole*, **112**, 196-219.

HULL, H.M., R.W. HOSHAW and J.-C. WANG, 1982: Cytofluorometric determination of nuclear DNA in living and preserved algae. *Stain Technol.*, **57**, 273-282.

IGNATIADES, L. and T.J. SMAYDA,1970: Autecological studies on the marine diatom *Rhizosolenia fragilissima* Bergon. I. The influence of light, temperature, and salinity. *J. Phycol.*, **6**, 332 339.

飯塚昭二, 1972: 大村湾における *Gymnodinium* '65年型種赤潮の発生機構. 日本プランクトン学会報, **19**, 22 33.

飯塚昭二, 1987: 群成長・生物間関係・行動生態.「赤潮の科学」（岡市友利編）恒星社厚生閣, 東京, 91-123.

飯塚昭二, 1989: (4)ギムノディニウムの生理・生態に関する基礎研究. 無酸素化現象と *Gymnodinium* 赤潮発生との関連に関する研究.「昭和63年度赤潮対策技術開発試験報告書　2－生物的赤潮防除技術開発試験」, 1-17.

飯塚昭二・入江春彦, 1966: 1965年夏期大村湾赤潮時の海況とその被害－II. 後期赤潮とその生物学的特徴について. 長崎大学水産学部研報, **21**, 67-101.

飯塚昭二・入江春彦, 1969a: 赤潮無発生年における赤潮プランクトンの動勢. 1966年大村湾の場合. 長崎大学水産学部研報, **27**, 19-37.

飯塚昭二・入江春彦, 1969b: 大村湾における *Gymnodinium* 赤潮発生と海底水無酸素化現象との関連. 日本プランクトン学会報, **16**, 99-115.

飯塚昭二・峯 邦宏, 1983: 培養条件下で期待される赤潮渦鞭毛藻 *Gymnodinium* sp.（'65年型種）の最高生長速度. 日本プランクトン学会報, **30**, 139-146.

飯塚昭二・中島敏光, 1975: 赤潮鞭毛藻の硫化物に対する反応. 日本プランクトン学会報, **22**, 27-32.

池田武彦, 1971: 赤潮プランクトンに関する研究－III. 海産ミドリムシの栄養生理について. 山口内海水試報, (2), 4-9.

池田武彦・松野 進・桃山和夫, 1987: 昭和60年夏季発生の *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮について. 山口内海水試報, **15**, 58 66.

今井 一郎, 1984: 周防灘における海洋細菌の粒子径組成と現存量. 南西水研研報, **17**, 183-196.

今井 一郎, 1990: 有害ラフィド藻 *Chattonella* のシストに関する生理生態学的研究. 南西水研研報, **23**, 63 166.

今井一郎・伊藤克彦・安楽正照, 1984: 播磨灘における *Chattonella* 耐久細胞の分布と発芽温度. 日本プランクトン学会報, **31**, 35-42.

IMAI, I. and K. ITOH, 1987: Annual life cycle of *Chattonella* spp., causative flagellates of noxious red tides in the Inland Sea of Japan. *Mar. Biol.*, **94**, 287-292.

IMAI, I. and K. ITOH, 1988: Cysts of *Chattonella antiqua* and *C. marina* (Raphidophyceae) in sediments of the Inland Sea of Japan. *Bull. Plankt. Soc. Japan*, **35**, 35-44.

今井一郎・伊藤克彦・寺田和夫・神薗真人, 1986: 周防灘における *Chattonella* 耐久細胞の分布と夏季の赤潮. 日水誌, **52**, 1665-1671.

入江春彦・浜島謙太郎, 1966: 1965年夏期大村湾赤潮時の海況とその被害－Ⅰ. 1965年夏期大村湾赤潮の概説. 長崎大学水産学部研報, **21**, 59-65.

ISHIDA, Y., M. EGUCHI and H. KADOTA, 1986: Existence of obligately oligotrophic bacteria as a dominant population in the South China Sea and the West Pacific Ocean. *Mar. Ecol. -Prog. Ser.*, **30**, 197 203.

ISHIMARU, T., T. TAKEUCHI, Y. FUKUYO and M. KODAMA, 1989: The selenium requirement of *Gymnodinium nagasakiense*. In "Red Tides: Biology, environmental science, and toxicology" (ed. by T. OKAICHI, D.M. ANDERSON and T. NEMOTO), Elsevier, New York, 357-360.

板倉 茂・今井一郎・伊藤克彦, 1990: 広島湾における赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* 出現密度の季節変化. 南西水研研報, **23**, 27-33.

板倉 茂・今井一郎・山口峰生・松尾 豊・伊藤克彦・寺田和夫・神薗真人・池内 仁, 1988: 1987年夏季の周防灘の海況と *Gymnodinium nagasakiense* 及び *Chattonella* spp. の出現状態.「赤潮の発生予知技術の開発に関する研究：昭和62年度研究報告書」(南西水研・東海水研), 7-17.

伊藤克彦・今井一郎, 1987: ラフィド藻.「赤潮生物研究指針」(日本水産資源保護協会編), 秀和, 東京, 122-130.

伊藤克彦・今井一郎・山口峰生・松尾 豊・安楽正照・寺田和夫・神薗真人, 1986: 1985年夏季に周防灘で発生した *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮の経過と海況.「赤潮の発生予知技術の開発に関する研究：昭和60年度研究報告書」(南西水研・東海水研), 7-18.

伊藤克彦・今井一郎・山口峰生・松尾 豊・寺田和夫・神薗真人・池内 仁, 1987: 1986年夏季, 周防灘における *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮の出現経過と海況.「赤潮の発生予知技術の開発に関する研究：昭和61年度研究報告書」(南西水研・東海水研), 7-19.

伊藤克彦・今井一郎・板倉 茂・山口峰生・松尾 豊・寺田和夫・神薗真人・池内 仁, 1990: 周防灘における *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮の発生環境の特徴.「赤潮の発生予知技術の開発に関する研究：5カ年の研究報告」(南西水研・東海水研), 145-158.

IWASAKI, H., 1961: The life-cycle of *Porphyra tenera* in vitro. *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole*, **121**, 173-187.

岩崎英雄, 1967: 微細藻類の分離と培養. 日本水産資源保護協会, 東京, 1-55.

岩崎英雄, 1971: 赤潮鞭毛藻に関する研究－Ⅵ. 1970年, 備後灘に出現した *Eutreptiella* sp. と *Exuviaella* sp. について. 日本海洋学会誌, **27**, 152-157.

岩崎英雄, 1973: 赤潮鞭毛藻の生理特性からみた赤潮の発生機構. 日本プランクトン学会報, **19**, 46 56.

IWASAKI, H., 1979: Physiological ecology of red tide flagellates. In "Biochemistry and physiology of protozoa" (ed. by M. LEVANDOWSKY and S.H. HUTNER), 2nd Ed. Vol.1, Academic Press, New York, 357-393.

IWASAKI, H., C.-H. KIM and M. TSUCHIYA, 1990: Growth characteristics of a dinoflagellate *Gymnodinium nagasakiense* Takayama et Adachi. *Japan. J. Phycol.*, **38**, 155-161.

岩崎英雄・佐々田 憲, 1969: 赤潮鞭毛藻に関する研究－Ⅱ. 五ヶ所湾に出現した *Heterosigma inlandica* について. 日水誌, **35**, 943-947.

JITTS, H.R., C.D. MCALLISTER, K. STEPHENS and J.D.H. STRICKLAND, 1964: The cell division rates of some marine phytoplankters as a function of light and temperature. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **21**, 139-157.

城 久, 1986: 大阪湾における富栄養化の構造と富栄養化が漁業生産におよぼす影響について. 大阪水試研報, **7**, 1-174.

KARENTZ, D., 1983: Patterns of DNA synthesis and cell division in marine dinoflagellates. *J. Protozool.*, **30**, 581-588.

KASTEN, F. H., 1989: The origins of modern fluorescence microscopy and fluorescent probes. In "Cell structure and function by microspectrofluorometry" (ed. by E. KOHEN and J.G. HIRSCHBERG), Academic Press, San Diego, 3-50.

KELLER, M.D., R.C. SELVIN, W. CLAUS and R.R.L. GUILLARD, 1987: Media for the culture of oceanic ultraplankton. *J. Phycol.*, **23**, 633-638.

KIMURA, B., 1989: Studies on chemical and biological factors influencing the growth of *Uroglena americana*, a red tide Crysophyceae in Lake Biwa. *J. Shimonoseki Univ. Fish.*, **38**, 23-70.

高知県水産試験場，1979：昭和53年度漁場富栄養化対策技術開発試験報告書，1-68.

高知県水産試験場，1988：(5)ギムノディニウム・ナガサキエンセの増殖機構の解明および被害防止策の検討．「昭和62年度赤潮対策技術開発試験報告書　5　中層増殖性広域赤潮被害防止技術開発試験」，1-25.

小村久美男，1983：瀬戸内海の平均的海況．神戸海洋気象台彙報，**201**，10-39.

KUBAI, D. F. and H. RIS, 1969: Division in the dinoflagellate *Gyrodinium cohnii* (Schiller). *J. Cell Biol.*, **40**, 508-528.

九万田一巳・武田健二・荒牧孝行，1987：VI鹿児島湾海域　1.*Chattonella marina*の出現と海洋構造．「昭和61年度九州海域赤潮調査報告書(西海ブロック)」(水産庁・福岡県・佐賀県・長崎県・熊本県・鹿児島県・宮崎県)，149-168.

LEDERMAN, T.C. and P. TETT, 1981: Problems in modeling the photosynthesis-light relationship for phytoplankton. *Botanica mar.*, **24**, 125-134.

LEE, J.H. and H.S. KWAK, 1986: A study on the *Gymnodinium nagasakiense* red-tide in Jinhae Bay of Korea. *Korean J. Ecol.*, **9**, 149-160.

LEFTLEY, J.W. and P.J. SYRETT, 1973: Urease and ATP: urea amidolyase activity in unicellular algae. *J. Gen. Microbiol.*, **77**, 109-115.

LOEBLICH, A.R.III., 1976: Dinoflagellate evolution: speculation and evidence. *J. Protozool.*, **23**, 13-28.

LOEBLICH, A.R.III., 1977: Studies on synchronously dividing populations of *Cachonina niei*, a marine dinoflagellate. *Bull. japan. Soc. Phycol.*, **25**, Suppl. (Mem. Iss. Yamada), 119-128.

LOEBLICH, A.R.III., R.J. SCHMIDT and J.L. SHERLEY, 1981: Scanning electron microscopy of *Heterocapsa pygmaea* sp. nov., and evidence for polyploidy as a speciation mechanism in dinoflagellates. *J. Plankt. Res.*, **3**, 67-79.

LOPER, C.L., K.A. STEIDINGER and L.M. WALKER, 1980: A simple chromosome spread technique for unarmored dinoflagellates and implications of polyploidy in algal cultures. *Trans. Am. microsc. Soc.*, **99**, 343-346.

MACLEAN, J.L., 1977: Observations on *Pyrodinium bahamense* Plate, a toxic dinoflagellate, in Papua New Guinea. *Limnol. Oceanogr.*, **22**, 234-254.

MACISAAC, J.J., G.S. GRUNSEICH, H.E. GLOVER and C.M. YENTCH, 1979: Light and nutrient limitation in *Gonyaulax excavata*: Nitrogen and carbon trace results. In "Toxic dinoflagellate blooms" (ed. by TAYLOR, D.L. and H.H. SELIGER), Elsevier, New York, 107-110.

前川兼佑，1961：瀬戸内海，特に山口県沿海における漁業の調整管理と資源培養に関する研究．山口県内海水試調研業績，**11**，1-483.

MAHONEY, J.B and J.J.A. MCLAUGHLIN, 1977: The association of phytoflagellate blooms in Lower New York Bay with hypertrophication. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **28**, 53-65.

MAHONEY, J.B., P. OLSEN and M. COHN, 1990: Blooms of a dinoflagellate *Gyrodinium* cf. *aureolum* in New Jersey coastal waters and their occurrence and effects worldwide. *J. coast. Res.*, **6**, 121-135.

松野　進・池田武彦・桃山和夫，1988：昭和61年夏季に発生した *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮について．山口内海水試報，**16**，142-148.

MASTUOKA, K., S. IIZUKA, H. TAKAYAMA, T. HONJO, Y. FUKUYO and T. ISHIMARU, 1989: Geographic distribution of *Gymnodinium nagasakiense* TAKAYAMA et Adachi around west Japan. In "Red Tides: Biology, environmental science, and toxicology" (ed. by T. OKAICHI, D.M. ANDERSON and T. NEMOTO), Elsevier, New York, 101-104.

MCCARTHY, J.J., 1972: The uptake of urea by marine phytoplankton. *J. Phycol.*, **8**, 216-222.

MCDUFF, R.E. and S.W. CHISHOLM, 1982: The calculation of in situ growth rates of phytoplankton

populations from fractions of cells undergoing mitosis: a clarification. *Limnol. Oceanogr.*, **27**, 783-788.

McLachlan, J., 1979: Growth media-marine. In "Handbook of phycological methods. Culture method & growth measurements" (ed. by J.R. Stein), Cambridge Univ. Press, Cambridge, 25-52.

Mitchison, J.M., 1984: Dissociation of cell cycle events. In "Cell cycle clocks" (ed. by L.N. Edmunds, Jr.), Marcel Dekker, New York, 163-171.

森 勇・入江春彦, 1966: 1965年夏期大村湾赤潮時の海況とその被害－III. 赤潮発生時の大村湾沖合域の海況. 長崎大学水産学部研報, **21**, 103-113.

村上彰男, 1976: 地理.「瀬戸内海の海域生態と漁業」(村上彰男編). フジテクノシステム, 東京, 3-13.

村上彰男, 1980: 富栄養化の抑制.「赤潮－発生機構と対策」(日本水産学会編)水産学シリーズ34, 恒星社厚生閣, 東京, 86-89.

Nagasaki, K., A. Uchida and Y. Ishida, 1991: A monoclonal antibody which recognizes the cell surface of red tide alga *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1211-1214.

Nakahara, H., 1978: Studies on phytoplankton in Maizuru Bay. I. Seasonal variation and vertical microdistribution. *Mem. Coll. Agric., Kyoto Univ.*, **112**, 49-82.

中原紘之, 1986: 藻類の生活史と生態.「藻類の生態」(秋山 優・有賀祐勝・坂本 充・横浜康継編), 内田老鶴圃, 東京, 533-592.

中原紘之・左子芳彦, 1987: 淡水植物プランクトンの生活史.「淡水赤潮」(門田 元編), 恒星社厚生閣, 東京, 21-77.

Nakamura, Y., T. Umemori, M. Watanabe, D.M. Kulis and D.M. Anderson, 1990: Encystment of *Chattonella antiqua* in laboratory cultures. *J. oceanogr. Soc. Japan*, **46**, 35-43.

Nakamura, Y. and M.M. Watanabe, 1983a: Growth characteristics of *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae) Part 1. Effects of temperature, salinity, light intensity and pH on growth. *J. oceanogr. Soc. Japan*, **39**, 110-114.

Nakamura, Y. and M.M. Watanabe, 1983b: Growth characteristics of *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae) Part 2. Effects of nutrients on growth. *J. oceanogr. Soc. Japan*, **39**, 151-155.

Nakamura, Y. and M.M. Watanabe, 1983c: Nitrate and phosphate uptake kinetics of *Chattonella antiqua* grown in light/dark cycles. *J. oceanogr. Soc. Japan*, **39**, 167-170.

中田憲一・飯塚昭二, 1987: 赤潮渦鞭毛藻 *Gymnodinium nagasakiense* の越冬に関する一観察. 日本プランクトン学会報, **34**, 199-201.

Nemoto, Y., T. Kuroiwa and M. Furuya, 1987: Photocontrol of nuclear DNA replication in *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *Plant Cell Physiol.*, **28**, 1043-1049.

Nichols, H.W., 1980: Polyploidy in algae. In "Ploypoidy; biological relevance" (ed. by W. H. Lewis), Plenum Press, New York, 151-161.

西島敏隆, 1985: 沿岸海域におけるB群ビタミンの動態に関する研究 －赤潮の発生に関連して－. 高知大学農学部紀要, **43**, 1-154.

西村昭史, 1982: 魚類養殖漁場の有機汚染が赤潮生物 *Gymnodinium* type-'65および *Chattonella antiqua* の増殖に及ぼす影響. 日本プランクトン学会報, **29**, 1-7.

野村和弘・星野孝夫, 1988: 試料作成法 染色法 DNA.「フローサイトメトリー －手技と実際－」(太田和雄監修, 野村和弘・高本 滋編) 改訂第2版, 蟹書房, 東京, 59-74.

野呂忠秀・水野 純・野沢治治, 1981: 大村湾産赤潮鞭毛藻 *Gymnodinium* sp. ('65年型) の超微細構造. 鹿児島大学水産学部紀要, **30**, 179-189.

Norris, L. and K.K. Chew, 1975: Effect of environmental factors on growth of *Gonyaulax catenella*. In "Proceedings of the first international conference on toxic dinoflagellates" (ed. by V.R. LoCicero), Mass. Sci. Technol. Found., Massachusetts, 143-152.

農林水産省統計情報部, 1990: 平成元年漁業養殖業生産統計年報, 1-280.

野沢治治, 1984: 鹿児島湾における赤潮生物の生理特性に関する研究.「大規模赤潮の形成及び赤潮被害抑止に関する研究: 5年間の研究成果」(南西水研・東海区水研・水産大学校), 139-152.

沼口克之・平山和次, 1972: 大村湾赤潮原因種 *Gymnodinium* '65年型種の培養に好適な pH と塩分に

ついて．長崎大学水産学部研報，**33**，7-10.
尾田方七，1935：*Gymnodinium mikimotoi* Miyake et Kominami n. sp. (MS.) の赤潮と硫酸銅の効果．動物学雑誌，**47**，35-48.
大野正夫・井本成彬・八塚 剛，1971：浦の内湾の海洋学的調査(1968～1969)．宇佐臨海実験所研究報告，**18**，1-23.
太田和雄，1988：巻頭言．「フローサイトメトリー －手技と実際－」(太田和雄監修，野村和弘・高本滋編) 改訂第2版，蟹書房，東京，1-3.
岡市友利，1980：魚介類の被害防止策．「赤潮－発生機構と対策」(日本水産学会編) 水産学シリーズ34，恒星社厚生閣，東京，124-138.
OLSON, R.J. and S.W. CHISHOLM, 1986: Effects of light and nitrogen limitation on the cell cycle of the dinoflagellate *Amphidinium carteri*. *J. Plankt. Res.*, 8, 785-793.
OLSON, R.J., S.L. FRANKEL, S.W. CHISHOLM and H.M. SHAPIRO, 1983: An inexpensive flow cytometer for the analysis of fluorescence signals in phytoplankton: chlorophyll and DNA distributions. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **68**, 129-144.
OLSON, R.J., D. VAULOT and S.W. CHISHOLM, 1986: Effects of environmental stresses on the cell cycle of two marine phytoplankton species. *Pl. Physiol.*, **80**, 918-925.
小野知足，1988：播磨灘における赤潮生物の細胞周期と群生長速度．香川赤潮研報，**3**，1-67.
大内 晟・高山晴義，1984：赤潮図による *Gymnodinium* '65年型種赤潮の予察について．日水誌，**50**，1201-1205.
PARTENSKY, F. and A. SOURNIA, 1986: Le dinoflagellé *Gyrodinium* cf. *aureolum* dans le plancton de l'Atlantique nord: identification, écologie, toxicité. *Cryptogam. Algol.*, **7**, 251-275.
PARTENSKY, F., D. VAULOT, A. COUTÉ and A. SOURNIA, 1988: Morphological and nuclear analysis of the bloom-forming dinoflagellates *Gyrodinium* cf. *aureolum and Gymnodinium nagasakiense*. *J. Phycol.*, **24**, 408-415
PERRY, M.J., 1976: Phosphate utilization by an oceanic diatom in phosphorus-limited chemostat culture and in the oligotrophic waters of the central North Pacific. *Limnol. Oceanogr.*, **21**, 88-107.
PFIESTER, L.A., 1975: Sexual reproduction of *Peridinium cinctum* f. *ovoplanum* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **11**, 259-265.
PFIESTER, L.A., 1976: Sexual reproduction of *Peridinium willei* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **12**, 234 238.
PFIESTER, L.A., 1977: Sexual reproduction of *Peridinium gatunense* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **13**, 92-95.
PFIESTER, L.A. and D.M. ANDERSON, 1987: Dinoflagellate reproduction. In "The biology of dinoflagellates" (ed. by F.J.R. TAYLOR), Blackwell, Oxford, 611-648.
POLLINGHER, U. and C. SERRUYA, 1976: Phased division of *Peridinium cinctum* f. *westii* (Dinophyceae) and development of the Lake Kinneret (Israel) bloom. *J. Phycol.*, **12**, 162-170.
POLLINGHER, U. and E. ZEMEL,1981: In situ and experimental evidence of the influence of turbulence on cell division processes of *Peridinium cinctum* forma *westii* (Lemm.) Lefevre. *Br. phycol. J.*, **16**, 281-287.
PUISEUX-DAO, S., 1981: Cell-cycle events in unicellular algae. In "Physiological bases of phytoplankton ecology" (ed. by T. PLATT), *Can. Bull. Fish. aquat. Sci.*, **210**, 130-149.
QASIM, S.Z., P.M.A. BHATTATHIRI and V.P. DEVASSY, 1972: The influence of salinity on the rate of photosynthesis and abundance of some tropical phytoplankton. *Mar. Biol.*, **12**, 200-206.
REDALJE, D.G. and E.A. LAWS, 1981: A new method for estimating phytoplankton growth rates and carbon biomass. *Mar. Biol.*, **62**, 73-79.
REYNOLDS, C.S., 1984: The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1-384.
RHEE, G-Y. and I.J. GOTHAM, 1981: The effect of environmental factors on phytoplankton growth: temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.*,

26, 635-648.

RICHMAN, S. and J.N. ROGERS, 1969: The feeding of *Calanus helgolandicus* on synchronously growing populations of the marine diatom *Ditylum brightwellii*. *Limnol. Oceanogr.*, **14**, 701-709.

RIVKIN, R.B. and E. SWIFT, 1982: Phosphate uptake by the oceanic dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca*. *J. Phycol.*, **18**, 113-120.

RIVKIN, R.B. and M.A. VOYTEK, 1986: Cell division rates of eucaryotic algae measured by tritiated thymidine incorporation into DNA: Coincident measurements of photosynthesis and cell division of individual species of phytoplankton isolated from natural populations. *J. Phycol.*, **22**, 199-205.

RIZZO, P.J., 1987: Biochemistry of the dinoflagellate nucleus. In "The biology of dinoflagellates" (ed. by F.J.R. TAYLOR), Blackwell, Oxford, 143-173.

ROMEO, A.J. and N.S. FISHER, 1982: Intraspecific comparisons of nitrate uptake in three marine diatoms. *J. Phycol.*, **18**, 220-225.

左子芳彦・石田祐三郎, 1986: 渦鞭毛藻における有性生殖の生態学的意義.「微生物の生態14　進化をめぐって」(日本微生物生態学会編), 学会出版センター, 東京, 99-113.

SAKO, Y., Y. ISHIDA, H. KADOTA and Y. HATA, 1984: Sexual reproduction and cyst formation in the freshwater dinoflagellate *Peridinium cunningtonii*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 743-750.

SAKO, Y., Y. ISHIDA, H. KADOTA and Y. HATA, 1985: Excystment in the freshwater dinoflagellate *Peridinium cunningtonii*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 267-272.

SAKO, Y., Y. ISHIDA, T. NISHIJIMA and Y. HATA, 1987: Sexual reproduction and cyst formation in the freshwater dinoflagellate *Peridinium penardii*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 473-478.

SAKO, Y., A. UCHIDA and Y. ISHIDA, 1989: Electrophoretic analysis of isozymes in red tide dinoflagellates (*Gymnodinium nagasakiense*, *Protogonyaulax catenella* & *Peridinium bipes*). In "Red Tides: Biology, environmental science, and toxicology" (ed. by T. OKAICHI, D.M. ANDERSON and T. NEMOTO), Elsevier, New York, 325-328.

SHELDON, R.W. and W.H. SUTCLIFFE, Jr., 1978: Generation times of 3 h for Sargasso Sea microplankton determined by ATP analysis. *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 1051-1055.

SHIMURA, S., H. SHIBUYA and S. ICHIMURA, 1979: Growth and photosynthesis properties of some planktonic marine diatoms at various salinity regimes. *La Mer*, **17**, 149-155.

塩川　司・入江春彦, 1966: 1965年夏期大村湾赤潮時の海況とその被害－VI. 赤潮による水産被害について. 長崎大学水産学部研報, **21**, 115-129.

代田昭彦, 1980: 赤潮生物の駆除.「赤潮－発生機構と対策」(日本水産学会編) 水産学シリーズ 34, 恒星社厚生閣, 東京, 105-123.

SHYAM, R. and Y.S.R.K. SARMA, 1978: Cytology of Indian freshwater Dinophyceae. *Bot. J. Linn. Soc.*, **76**, 145-159.

SIGEE, D.C., 1986: The dinoflagellate chromosome. *Adv. bot. Res.*, **12**, 205-264.

SLATER, M.L., S.O. SHARROW and J.J. GART, 1977: Cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* in populations growing at different rates. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A*, **74**, 3850-3854.

SMAYDA, T.J., 1969: Experimental observations on the influence of temperature, light, and salinity on cell division of the marine diatom, *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *J. Phycol.*, **5**, 150-157.

SMAYDA, T.J., 1973: The growth of *Skeletonema costatum* during a winter-spring bloom in Narragansett Bay, Rhode Island. *Norw. J. Bot.*, **20**, 219-247.

SMAYDA, T.J., 1980: Phytoplankton species succession. In "The physiological ecology of phytoplankton" (ed. by I. MORRIS), Blackwell, Oxford, 493-570.

SMETACEK, V.S., 1985: Role of sinking in diatom life-history cycles: ecological, evolutionary and geological significance. *Mar. Biol.*, **84**, 239-251.

SPECTOR, D.L., 1984: Dinoflagellate nuclei. In "Dinoflagellates" (Ed. by D.L. SPECTOR), Academic

Press, Orlando, 107-147.

SPECTOR, D.L., A.C. VASCONCELOS and R.E. TRIEMER, 1981: DNA duplication and chromosome structure in the dinoflagellates. *Protoplasma,* **105**, 185-194.

STEARNS, D.E., 1986: Copepod grazing behavior in simulated natural light and its relation to nocturnal feeding. *Mar. Ecol. -Prog. Ser.,* **30**, 65-76.

STEIDINGER, K.A., 1975: Basic factors influencing red tides. In "Proceedings of the first international conference on toxic dinoflagellates" (ed. by V.R. LOCICERO), Mass. Sci. Technol. Found., Massachusetts, 153-162.

STOLBOVA, N.G., V.I. VEDERNIKOV and A.S. MIKAELYAN, 1982: Diurnal cell-division rhythm of dinoflagellates from the Black Sea. *Oceanology,* **22**, 365-368.

STOSCH, H.A.VON, 1973: Observations on vegetative reproduction and sexual life cycles of two freshwater dinoflagellates, *Gymnodinium pseudopalustre* Schiller and *Woloszynskia apiculata* sp. nov. *Br. phycol. J.,* **8**, 105-134.

杉山 宏・佐々木康夫・飯塚昭二, 1979: 赤潮時における鞭毛藻の光　光合成曲線. 長崎大学水産学部研報, **47**, 29-33.

水産庁九州漁業調整事務所, 1990: 平成元年九州海域の赤潮. 1-55.

水産庁・三重県・和歌山県, 1986: 昭和59年熊野灘に発生したギムノディニウム・ナガサキエンセ赤潮に関する調査報告書. 1-140.

水産庁瀬戸内海漁業調整事務局, 1973: 昭和47年夏期東部瀬戸内海養殖はまち大量へい死事故の全容. 1-51.

水産庁瀬戸内海漁業調整事務所, 1973-1990: 瀬戸内海の赤潮.

水産庁瀬戸内海漁業調整事務所, 1986: 昭和60年夏期西部瀬戸内海ギムノディニウム赤潮の発生状況と被害の概要. 1-18.

水産庁瀬戸内海漁業調整事務所, 1988: 昭和62年夏期東部瀬戸内海シャットネラ赤潮の発生状況と被害の概要. 1-79.

鈴木玲子・石丸 隆, 1988: *Gymnodinium nagasakiense* の色素組成. 1988年度日本海洋学会秋季大会講演要旨集, 日本海洋学会, 232.

SWEENY, B.M. and J.W. HASTINGS, 1958: Rhythmic cell division in populations of *Gonyaulax polyedra. J. Protozool.,* **5**, 217-224.

SWIFT, E. and E.G. DURBIN, 1972: The phased division and cytological characteristics of *Pyrocystis* spp. can be used to estimate doubling times of their populations in the sea. *Deep-Sea Res.,* **19**, 189-198.

高橋 学, 1983: Flow Cytometry の生物学への応用. 化学と生物, **21**, 728-738.

TAKAHASHI, M. and N. FUKAZAWA, 1982: A mechanism of "red-tide" formation. II. Effect of selective nutrient stimulation on the growth of different phytoplankton species in natural water. *Mar. Biol.,* **70**, 267-273.

TAKANO, H., 1963: Diatom culture in artificial sea water-I. Experiments on five pelagic species. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.,* **37**, 17-25.

高野秀昭, 1971: 渦鞭毛藻 *Gymnodinium mikimotoi* の原記載. 日本プランクトン学会報, **18**, 103-104.

高山晴義, 1981: 走査電子顕微鏡による *Gymnodinium* 属2種の観察. 日本プランクトン学会報, **28**, 121-129.

高山晴義, 1983: 広島県沿岸に出現する赤潮生物－Ⅰ. *Chattonella antiqua* (Hada) Ono と *Chattonella marina* (Subrahmanyan) Hara et Chihara. 広島水試研報, **13**, 59-64.

高山晴義, 1986: 広島県沿岸に出現する赤潮生物－Ⅳ, ナガサキハダカウズモ *Gymnodinium nagasakiense* TAKAYAMA et Adachi. 広島水試研報, **16**, 39-44.

TAKAYAMA, H. and R. ADACHI, 1984: *Gymnodinium nagasakiense* sp. nov., a red-tide forming dinophyte in the adjacent waters of Japan. *Bull. Plankt. Soc. Japan,* **31**, 7-14.

竹内照文・金盛浩吉・渡辺勇一郎・芳養晴雄・金丸誠司・中西　・・小川満也・竹内淳・・南 忠七, 1986: 1984年7月熊野灘南部域に出現した *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮について（調査報告）. 和歌山県水試事業報告, 昭和59年度, 54-111.

TANAKA, N., M. SUGIYAMA and K. OHWADA, 1983: Ecological studies of phytoplankton in Ago Bay with special reference to the relation between growth and salinity. *Bull. Plankt. Soc. Japan,* **30**, 1-10.

田中俊次・藤田真吾・杉山元彦・西岡 純・中西雅幸, 1977: 1975年10月, 舞鶴湾で発生した *Hemieutreptia antiqua* 赤潮について. 京都府立海洋センター研報, **1**, 94-112.

田中義興・川上大和・川辺克己, 1979: 博多湾における *Gymnodinium* '65型種の出現と環境について. 福岡県福岡水試研業報告, 昭和52年度, 171-181.

田中 豊・垂水共之・脇本和昌, 1984: パソコン統計解析ハンドブック II多変量解析編, 共立出版, 東京, 16-37.

TANGEN, K., 1977: Blooms of *Gyrodinium aureolum* (Dinophyceae) in north European waters, accompanied by mortality in marine organisms. *Sarsia,* **63**, 123 133.

TANGEN, K. and T. BJÖRNLAND, 1981: Observations on pigments and morphology of *Gyrodinium aureolum* Hulburt, a marine dinoflagellate containing 19'-hexanoyloxyfucoxanthin as the main carotenoid. *J. Plankt. Res.,* **3**, 389-401.

TAYLOR, F.J.R., 1985: The taxonomy and relationships of red tide flagellates. In "Toxic dinoflagellates" (ed. by D.M. ANDERSON, A.W. WHITE and D.G. BADEN), Elsevier, New York, 11 26.

寺田和夫, 1987: *Gymnodinium nagasakiense* の昼夜移動について. 福岡県豊前水試研業報, 昭和60年度, 169-170.

寺田和夫・池内 仁・高山晴義, 1987: 冬季の周防灘沿岸で観察された *Gymnodinium nagasakiense*. 日本プランクトン学会報, **34**, 201-204.

寺田和夫・神薗真人, 1986: 昭和59年7月周防灘に発生した *Chattonella* 赤潮について. 福岡豊前水試研報 (昭和59年度), 106-117.

寺田和夫・神薗真人・佐々木和之, 1982: 豊前海の赤潮とその発生環境について. 福岡豊前水試研報 (昭和55年度), 91-106.

寺田和夫・神薗真人・渡辺昭二, 1981: 豊前海の赤潮発生状況について 第VIII報. 福岡豊前水試研報(昭和54年度), 87-93.

THOMAS, W.H. and A.N. DODSON, 1968: Effects of phosphate concentration on cell division rates and yield of a tropical oceanic diatom. *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole,* **134**, 199-208.

THOMAS, W.H. and A.N. DODSON, 1974: Effect of interactions between temperature and nitrate supply on the cell-division rates of two marine phytoplankton. *Mar. Biol.,* **24**, 213-217.

TOMAS, C.R., 1978: *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae). I. Effects of salinity and temperature on growth, motility and survival. *J. Phycol.,* **14**, 309-313.

TOMAS, C.R., 1979: *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae). III. Uptake and utilization of nitrogen and phosphorus. *J. Phycol.,* **15**, 5-12.

TOMAS, C.R., 1980: *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae). IV. Effects of light intensity and temperature on photosynthesis, and cellular composition. *J. Phycol.,* **16**, 149-156.

TORIUMI, S., 1976: Cell division in marine *Ceratium*. II. Mitotic behavior and phasing in cell division. *Cytologia,* **41**, 445-452.

TRIEMER, R.E. and L. FRITZ, 1984: Cell cycle and mitosis. In "Dinoflagellates" (ed. by D.L. SPECTOR), Academic Press, Orlando, 149-179.

UCHIDA, T., 1976: Excretion of ammonia by *Prorocentrum micans* Ehrenberg in urea-grown culture. *Japan. J. Ecol.,* **26**, 43-44.

内田卓志, 1991: 室蘭産 *Scrippsiella trochoidea* の有性生殖. 日水誌, **57**, 1215.

UYE, S. and K. TAKAMATSU, 1990: Feeding interactions between planktonic copepods and red-tide flagellates from Japanese coastal waters. *Mar. Ecol. -Prog. Ser.,* **59**, 97-107.

VAULOT, D., R.J. OLSON and S.W. CHISHOLM, 1986: Light and dark control of the cell cycle in two marine phytoplankton species. *Exp. Cell Res.,* **167**, 38-52.

VAULOT, D., R.J. OLSON, S. MERKEL and S.W. CHISHOLM, 1987: Cell-cycle response to nutrient starvation in two phytoplankton species, *Thalassiosira weissflogii* and *Hymenomonas carterae.*

Mar. Biol., **95**, 625-630.

WALL, D., 1971: Biological problem concerning fossilizable dinoflagellates. *Geoscience and Man*, **3**, 1-15.

WALL, D., 1975: Taxonomy and cysts of red tide dinoflagellates. In "Proceedings of the first international conference on toxic dinoflagellates" (ed. by V.R. LOCICERO), Mass. Sci. Technol. Found., Massachusetts, 249-255.

WATANABE, M.M., Y. NAKAMURA, S. MORI and S. YAMOCHI, 1982: Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Heterosigma akashiwo* Hada from Osaka Bay, Japan. *Japan. J. Phycol.*, **30**, 279-288.

WATRAS, C.J., S.W. CHISHOLM and D.M. ANDERSON, 1982: Regulation of growth in an estuarine clone of *Gonyaulax tamarensis* Lebour: salinity-dependent temperature responses. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **62**, 25-37.

WEILER, C.S. and S.W. CHISHOLM, 1976: Phased cell division in natural populations of marine dinoflagellates from shipboard cultures. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **25**, 239-247.

WEILER, C.S. and R.W. EPPLEY, 1979: Temporal pattern of division in the dinoflagellate genus *Ceratium* and its application to the determination of growth rate. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **39**, 1-24.

WHITE, A.W., 1976: Growth inhibition caused by turbulence in the toxic marine dinoflagellate *Gonyaulax excavata*. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **33**, 2598-2602.

WONG, P.S., 1989: The occurrence and distribution of red tides in Hong Kong-applications in red tide management. In "Red Tides: Biology, environmental science, and toxicology" (ed. by T. OKAICHI, D.M. ANDERSON and T. NEMOTO), Elsevier, New York, 125-128.

山本千裕・寺井千尋・田中義興, 1989: I 福岡湾海域 1.*Gymnodinium nagasakiense* による赤潮発生と環境.「昭和63年度九州海域赤潮調査報告書（西海ブロック）」（水産庁・福岡県・佐賀県・長崎県・熊本県・鹿児島県・宮崎県), 1-8.

矢持 進, 1984: 大阪湾に出現する赤潮鞭毛藻 6種の増殖に及ぼす水温の影響. 日本プランクトン学会報, 31, 15-22.

YENTSCH, C.M., F.C. MAGUE, P.K. HORAN and K. MUIRHEAD, 1983: Flow cytometric DNA determinations on individual cells of the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis* var. *excavata*. *J. expl mar. Biol. Ecol.*, **67**, 175-183.

YODER, J.A., 1979: Effect of temperature on light-limited growth and chemical composition of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **15**, 362-370.

米田勇一・吉田陽一, 1957: 赤潮の生理生態学的研究－Ⅰ. 赤潮プランクトンの垂直的移動について (1). 日水誌, **19**, 405-409.

吉田陽一, 1980: 赤潮の発生予察.「赤潮－発生機構と対策」（日本水産学会編）水産学シリーズ 34, 恒星社厚生閣, 東京, 90-104.

吉田陽一・河口克己, 1983: *Chattonella antiqua* (Hada) Ono の浮上性および走光性. 日本プランクトン学会報, **30**, 11-19.

吉松定昭・小野知足・藤沢節茂, 1985: 1982年備讃瀬戸西部海域に発生した *Gymnodinium nagasakiense* 赤潮. 香川赤潮研報, **1**, 17-27.

吉松定昭・小野知足, 1986: 播磨灘南部での赤潮生物および鞭毛藻類の季節的消長. 香川赤潮研報, **2**, 1 42.

ZINGMARK, R.G., 1970: Sexual reproduction in the dinoflagellate *Noctiluca milialis* Suriray. *J. Phycol.*, **6**, 122-126.

BULLETIN OF NANSEI NATIONAL FISHERIES RESEARCH INSTITUTE

is issued each year with one or two numbers. All communications relating to this Bulletin should be addressed to Director. Exchange of publication will be highly appreciated.

Address

The Nansei National Fisheries Research Institute
Director & Administrative Section
Inland Sea Resources Management Division
Resources Enhancement Division
Red Tide Research Division
17-5, Maruishi 2-chome, Ohno-cho, Saeki-gun,
Hiroshima 739-04, JAPAN

Pacific Coast Research Division
1-21, Sanbashidori 6-chome, Kochi-shi,
Kochi 780, JAPAN

〔非売品〕

平成6年3月10日 印 刷　　平成6年3月15日 発 行

広島県佐伯郡大野町丸石2－17－5
発 行 者　南西海区水産研究所
畔 田 正 格

印 刷 所　株式会社中本本店

南西水研研報
Bull. Nansei Natl. Fish.
Res. Inst. No.27, 1-394, 1994.

Contents

Minoru ISHIDA
Phylogeny of the Suborder Scorpaenoidei (Pisces: Scorpaeniformes) ·····1

Nobuhiro SUZUKI
Ultrastructure of the Skin on Reverse Side of Hatchery- Reared Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus* with Reference to the Pigmentation ·····113

Norihisa OSEKO
Pathology for hirame rhabdovirus (*Rhabdovirus olivaceus*) ·····129

Masami HAMAGUCHI, Hironori USUKI, and Hiroko ISHIOKA
Effects of Steroids on Mitogenetic Response of Thymic Lymphocytes prepared from Red Sea Bream, *Pagrus major* ·····233

Takuji UCHIDA
Effects of Temperature on the Encystment and Excystment of a Dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea* Isolated from Muroran Harbor, Hokkaido·····243

Mineo YAMAGUCHI
Physiological Ecology of the Red Tide Flagellate *Gymnodinium nagasakiense* (Dinophyceae)
— Mechanism of the Red Tide Occurrence and its Prediction — ·····251